

Zur Bedeutung spannungsabhängiger Natriumkanäle für die Migration der Gliomzelllinie 1321N1

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. Med. Rüdiger Feltz

geboren am 09. September 1958 in Leipzig

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Dritter Gutachter:

Tag der öffentlichen Verteidigung:.....

1. Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
ATX II	Anemoneatoxin II
DNS	Desoxyribonukleinsäure
m RNA	messenger-Ribonukleinsäure
NGF	Nerve Growth Factor
RT-PCR	Reverse –Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaction
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk	Tyrosinkinase
TTX	Tetrodotoxin
V	Veratridin
ZNS	Zentralnervensystem

2. Inhaltsverzeichnis

1. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	3
2. INHALTSVERZEICHNIS	4
3. ZUSAMMENFASSUNG	7
4. EINLEITUNG	9
4.1. PATCH-CLAMP	10
4.2. NATRIUMKANÄLE	12
4.2.1. NOMENKLATUR UND EINTEILUNG	12
4.2.1.1. Nomenklatur nach Isoformen	12
4.2.1.2. Einteilung nach funktionellen Gesichtspunkten	13
4.2.2. STRUKTUR	14
4.2.3. FUNKTION DER SPANNUNGSGESTEUERTEN NATRIUMKANÄLE	16
4.2.3.1. Funktion in Neuronen und Muskelzellen	16
4.2.3.2. Spannungsabhängige Natriumkanäle in Gliazellen	16
4.2.4. IONENKANÄLE IN TUMOREN	17
4.2.4.1. Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen	17
4.2.5. GRUNDLAGEN DER BEEINFLUSSUNG VON NATRIUMKANÄLEN	18
4.3. INDUKTION VON NATRIUMKANÄLEN DURCH SERUMENTZUG UND NGF	19
4.3.1. WAS IST NGF?	19
4.3.2. WIRKUNG AUF GLIAZELLEN UND GLIOME	20
4.3.3. SERUMENTZUG	21
5. ZIELE DER ARBEIT	23
6. MATERIAL UND METHODE	24

6.1. ZELLKULTUR	24
6.2. BOYDEN-KAMMER	24
6.3. VERSUCHSANORDNUNG UND -AUSFÜHRUNG	26
6.3.1. SERIE 1: 25 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: NATRIUMKANALINDUKTION DURCH SERUMENTZUG, MOTILITÄT NACH TTX UND VERATRIDIN	27
6.3.2. SERIE 2: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: NATRIUMKANALINDUKTION DURCH SERUMENTZUG, MIGRATION NACH TTX UND VERATRIDIN.	28
6.3.3. SERIE 3: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. GABE VON NGF. THEMA: NATRIUMKANALINDUKTION DURCH SERUMENTZUG, MIGRATION NACH TTX UND VERATRIDIN.	28
6.3.4. SERIE 4: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: MIT SERUM, OHNE KANALINDUKTION, MOTILITÄT NACH TTX UND VERATRIDIN. ÜBERPRÜFUNG EINES DIREKTEN EINFLUSSES VON TTX UND VERATRIDIN AUF DIE MIGRATION DER ZELLEN OHNE NATRIUMKANALINDUKTION.	28
6.3.5. WIEDERHOLUNG SERIE 2 : 50 000 ZELLEN AUSSAAT. ZELLEN AN MEMBRANOBER- UND -UNTERSEITE BELASSEN. THEMA: EINFLUSS VON NGF AUF DIE PROLIFERATION, HIER OHNE NGF	29
6.3.6. WIEDERHOLUNG SERIE 3: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. ZELLEN AN MEMBRANOBER- UND -UNTERSEITE BELASSEN. THEMA: EINFLUSS VON NGF AUF DIE PROLIFERATION, HIER MIT NGF	29
6.4. VERSUCHSAUSWERTUNG	29
6.4.1. ZELLZÄHLUNG	29
6.4.2. STATISTIK	30
7. ERGEBNISSE	31
7.1. SERIE 1: 25 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: NATRIUMKANALINDUKTION DURCH SERUMENTZUG, MOTILITÄT NACH TTX UND VERATRIDIN.	32
7.2. SERIE 2: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: NATRIUMKANALINDUKTION DURCH SERUMENTZUG,, MOTILITÄT NACH TTX UND VERATRIDIN.	33
7.3. SERIE 3: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: NATRIUMKANALINDUKTION DURCH SERUMENTZUG UND NGF-ZUSATZ. MOTILITÄT NACH TTX UND VERATRIDIN.	35
7.4. SERIE 4: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. THEMA: MIT SERUM, OHNE KANALINDUKTION, MOTILITÄT NACH TTX UND VERATRIDIN ÜBERPRÜFUNG	

EINES DIREKTEN EINFLUSSES VON TTX UND VERATRIDIN AUF DIE MIGRATION DER ZELLEN OHNE NATRIUMKANALINDUKTION.	36
7.5. WIEDERHOLUNG SERIE 2: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. ZELLEN AN MEMBRANOBER- UND UNTERSEITE BELASSEN. THEMA: EINFLUß VON NGF AUF DIE PROLIFERATION, HIER: OHNE NGF.	38
7.6. WIEDERHOLUNG SERIE 3: 50 000 ZELLEN AUSSAAT. ZELLEN AN MEMBRANOBER- UND UNTERSEITE BELASSEN. THEMA: EINFLUß VON NGF AUF DIE PROLIFERATION, HIER: MIT NGF	39
7.7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	41
8. DISKUSSION	42
8.1. DIE ROLLE SPANNUNGSGESTEUERTER NATRIUMKANÄLE FÜR DIE MIGRATION	42
8.1.1. MÖGLICHE BEDEUTUNG DER NATRIUMKANALBLOCKADE FÜR MIGRATION VON 1321 N1	43
8.1.2. MÖGLICHE BEDEUTUNG DER NATRIUMKANALAKTIVIERUNG FÜR DIE MIGRATION VON 1321N1	44
8.2. BEDEUTUNG VON IONENKANÄLEN FÜR DIE PROLIFERATION VON ZELLEN	46
9. SCHLUSSFOLGERUNGEN	50
10. LITERATUR	51

3. Zusammenfassung

Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren und zu den häufigsten Neoplasien des ZNS. Ihre histologische Klassifikation gibt Aufschluß über die Wachstumsgeschwindigkeit und Rezidivneigung und damit über die Prognose des Krankheitsbildes. Im Zusammenhang mit Ausdehnung, Lokalisation und Manifestationsalter wird über therapeutische und adjuvante Maßnahmen entschieden. Die in den letzten Jahren in der Molekularpathologie und Molekulargenetik erarbeiteten Methoden und Erkenntnisse haben auch in die Erforschung der Hirntumoren Eingang gefunden. So ist heute für zahlreiche phänotypische und biologische Merkmale des Tumorwachstums eine Korrelation zur Aktivität transformationsassoziierter Gene nachgewiesen.

Gliome, insbesondere infiltrierend wachsende Astrozytome neigen im Verlauf zur Entdifferenzierung und Malignisierung. Die physiologische Untersuchung transformierter glialer Zellen führte zum Genprodukt Ionenkanäle, wobei sich überraschend eine große Vielfalt von Kanal- und Rezeptorproteinen ergab

(Brismar 1995). Beobachtungen an Prostatakarzinomzellen der Ratte, dass stark zur Metastasierung neigende Zelllinien spannungsabhängige Natriumkanäle exprimieren und die Fähigkeit zur Metastasierung bei Blockade der Natriumkanäle verlieren, andererseits bei Aktivierung der Natriumkanäle sowohl bei stark- als auch schwachmetastasierenden Zelllinien eine Proliferationshemmung eintrat, ließ die mögliche Bedeutung der auch auf Gliomzellen in malignitätsassoziierter Vielfalt und Dichte nachgewiesenen spannungsabhängigen Natriumkanäle zum Untersuchungsgegenstand werden.

Ausgehend von den mit dem Natriumeinstrom in das Zytoplasma intrazellulär ablaufenden, meist energieverbrauchenden Vorgängen, wie Aktivierung der Natrium-Kalium-ATPase, Phosphorylierung und damit Aktivierung von DNS-Synthetasen, pH-Wertveränderungen und Arachidonsäuresynthese wäre auch für Gliomzellen eine mit diesen Vorgängen assoziierte Veränderung des Proliferations- und Migrationsverhaltens vorstellbar.

Die Charakterisierung von Membranströmen einzelner Zellen und der sie verursachenden Ionen mit Hilfe der *Patch-clamp-Technik* erlaubte den Nachweis von spannungsabhängigen, TTX-sensitiven Natriumkanälen in Gliomzellen. Die Bedeutung dieser Kanäle ist unklar. Ihr möglicher Einfluß auf

die Migration wurde in dieser Arbeit durch Blockade der Kanäle mit TTX (100 nmol) und Aktivierung mit Veratridin (50 μ mol, 100 μ mol) in der Boydenkammer untersucht. Dazu wurden bei Gliomzellen der Zelllinie 1321N1 durch Serumentzug und/oder NGF-Zusatz Natriumkanäle induziert und anschließend moduliert. Zum Ausschluß eines Einflusses von TTX und Veratridin selbst auf das Migrationsverhalten wurde in jeder Serie eine substanzfreie Kontrollgruppe mitgeführt, außerdem wurde eine Serie ohne Kanalinduktion den modulierenden Substanzen ausgesetzt, um zu sehen, ob Änderungen der Migration an die Existenz von Natriumkanälen gebunden sind. Es zeigte sich, dass weder Blockade noch Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle bei den Gliomzellen der Linie 1321N das Migrationsverhalten beeinflussten. Schrey et al. (2002) fanden in niedriggradigen Gliomen spannungsabhängige Natriumkanäle in hoher Dichte und Vielfalt (Schrey et al. 2002), was auf eine mögliche Bedeutung der Kanäle in diesen Tumoren hinweist. Es bieten sich daher weitere Untersuchungen an Primärkulturen und anderen Zelllinien auch unter Verwendung von anderen Zellgiften als Kanalmodulatoren an.

Wir fanden einen positiven Einfluss von NGF auf die Proliferation der Zellen, dieser ließ sich aber nicht signifikant reproduzieren.

4. Einleitung

Die Gliome gehören zu den neuroepithelialen Tumoren und mit einem Anteil von 40% zu den häufigsten Neoplasien des ZNS (Kleihues et al. 1995; Wiestler und Schmidt 1998). Die histologische Klassifikation der Tumoren und ihre Beziehung zu klinischen Gesichtspunkten wie Manifestationsalter, Ausdehnung, Lokalisation, Wachstumsgeschwindigkeit und Rezidivneigung waren hauptsächlich Wegweiser für die Entscheidung über adjuvante Therapie (Chemotherapie, Bestrahlung) und zur Einschätzung der Prognose. In den letzten Jahren sind ZNS-Tumoren Gegenstand der Grundlagenforschung, um reproduzierbare Korrelationen zwischen phänotypischen und genotypischen Veränderungen während der Tumorentstehung und des Wachstums zu sichern. Es ist allgemein anerkannt, dass eine breitgefächerte Variabilität im phänotypischen und biologischen Verhalten der Tumoren die Aktivität transformationsassoziiierter Gene widerspiegelt. Tumoren derselben Ursprungszelle können von einem langsam niedrigmalignen bis zu einem hochmalignen, die Umgebung infiltrierenden Wachstum variieren, morphologisch signifikant für Malignität sind dabei Zellatypien, Mitosen, hohe Zelldichte, vaskuläre Proliferation und Nekrosen.

Die Gliome, insbesondere infiltrierend wachsende Astrozytome, haben die Tendenz, sich im Verlauf zu weniger differenzierten, phänotypisch höher malignen Tumoren zu entwickeln, wobei, wie in anderen Geweben, dieser Wechsel eine sequentielle und kumulative Anhäufung genetischer Veränderungen reflektiert. Beispielsweise ist die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens lokalisiert auf dem Chromosom 19q eine der genetischen Veränderungen bei der Transformation von einem niedriggradigen zu einem hochgradigen malignen Astrozytom. Die Beobachtung, dass P 53 Mutationen sowohl in niedrig- wie in hochmalignen Astrozytomen oder Glioblastomen in gleicher Weise vorkommen, ließ vermuten, dass der Verlust der P 53-Funktion an einem wesentlich früheren Stadium der neoplastischen Transformation beteiligt ist (Kleihues et al. 1995).

Patienten mit Hirntumoren entwickeln oft eine Epilepsie, aber die Gründe, warum manche Patienten Anfälle bekommen und andere nicht, sind nicht bekannt (Patt et al. 2000). Gliompatienten zeigen epileptische Aktivität dichter

an der Hirn-Tumor-Grenze als solche mit glioneuralen Mischtumoren und Metastasen. *Patch-Clamp* von Zellen frischer Gliomschnitte ergaben keine Korrelation in Bezug auf Anwesenheit spannungsabhängiger Natriumkanäle in Tumorzellen und EEG-Befunden. Es ist auch nicht sicher, dass Gliomzellen infolge ihrer Fähigkeit, Aktionspotentiale zu generieren, direkt in die Entstehung tumorassoziierter Epilepsie involviert sind (Patt et al. 2000).

Die physiologische Untersuchung transformierter glialer Zellen führte zum Genprodukt Ionenkanäle, wobei sich eine unerwartete Präsenz und Vielfalt von Kanal- und Rezeptorproteinen ergab (Brismar 1995). Ausgehend von der Untersuchung spannungsabhängiger Ionenkanäle in Verbindung mit dem Metastasierungsverhalten beim Prostatakarzinom ist die Exprimierung von Ionenkanälen in Gliomzellen ein möglicher Indikator für biologisches Verhalten. Für Zelllinien des Prostatakarzinoms der Ratte wurde eine Hemmung der Proliferation bei Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanäle gefunden, die Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen mit Tetrodotoxin hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von schwach und stark zur Metastasierung neigenden Zelllinien, Öffnung der Natriumkanäle mit Veratridin führte jedoch dosisabhängig zu verminderter Proliferation (Fraser et al. 2000). Natriumkanalexprimierende Zellen zu starker Metastasierung neigender Zelllinien des Ratten-Prostatakarzinoms zeigten im Experiment eine gerichtete Bewegung im elektrischen Feld im Gegensatz zu schwach metastasierenden Zellen, welche keine spannungsabhängigen Natriumkanäle exprimieren (Djamgoz et al. 2001).

Die Messung von Ionenströmen an einzelnen Zellen war Voraussetzung für den Nachweis spannungsabhängiger Ionenkanäle.

4.1. Patch-Clamp

Die wichtigste Methode zur Untersuchung von Ionenkanälen ist die *Patch-Clamp*-Technik, die erstmals 1976 veröffentlicht wurde (Neher und Sakman 1976). Bis dahin war nur die Messung der Ströme vieler Ionenkanäle durch Einstechen von Glaspipetten in große Zellen möglich. Die Besonderheit der *Patch-Clamp*-Technik gegenüber der herkömmlichen *Voltage-Clamp*-Technik

war die elektrische Abdichtung der Plasmamembran einer einzelnen Zelle oder eines Fragments aus der Plasmamembran (Kraft und Patt 2004). *Patch*-Pipetten bestehen aus Quarzglas. Mit einer Öffnung von 1 μm werden sie mit Unterdruck auf die Lipidmembran aufgesetzt. Der umschlossene Membranfleck (*Patch*) ist nach Ausbildung des Kontaktes durch einen hohen elektrischen Widerstand gekennzeichnet. In die mit einer Elektrolytlösung gefüllte *Patch*-Pipette taucht eine Elektrode ein, eine zweite Elektrode taucht in die Badlösung, die die Zelle umgibt. Über die Elektroden wird der Zelle eine Steuerspannung aufgezwungen, sie wird geklemmt (*Clamp*). Um Ströme einzelner Ionenkanäle im Bereich von Picoampere zu messen, werden Verstärker mit Eingängen für die Pipettenelektrode und für die über die Badelektrode geerdete steuerbare Spannungsquelle eingesetzt. Spannungsunterschiede zwischen Pipettenelektrode (Membranspannung) und der Steuerspannung werden in ein verstärktes Signal am Verstärkerausgang umgewandelt. Zwischen Pipettenelektrode und Ausgang ist ein Rückkopplungswiderstand geschaltet, durch den solange Strom fließt, wie Membran- und Steuerspannung verschieden sind.

In der *Cell-Attached*-Konfiguration sind Öffnung und Schließung (*Gating*) einzelner Ionenkanäle als Zu- oder Abnahme der Stromamplitude zu erkennen (Hamill et al. 1981). Ionenkanäle, deren *Gating* durch intra- oder extrazelluläre Substanzen beeinflusst wird, werden durch die *Inside-Out*-Konfiguration charakterisiert (Hamill et al. 1981). Der aus der Lipidmembran durch Zurückziehen der Pipette herausgelöste *Patch* (zellfreier *patch*) wird mit seiner Innenseite der Badlösung zugewandt, deren Zusammensetzung im Gegensatz zum Zytoplasma zu variieren ist und die Ausspülung einer intrazellulär am Kanal wirkenden Substanz erlaubt. Das ermöglicht die Identifizierung der Ionenkanäle anhand ihrer Selektivität. Dafür wird das Umkehrpotential des durch den Kanal fließenden Stroms bestimmt, der Spannungswert, bei dem der Strom Null ist bzw. sein Vorzeichen umkehrt. Entsprechend $U = R \cdot I$ ist am Umkehrpunkt die auch den Kanalstrom treibende Spannung Null. Diese setzt sich aus der Steuerspannung U_{soll} und dem Gleichgewichtspotential E_a der beteiligten Ionen zusammen. $U = U_{\text{soll}} - E_a$. Am Umkehrpunkt gilt $U_{\text{soll}} = E_a$. Bei der *Inside-Out*-Konfiguration sind die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran bekannt. Das über die Nernst'sche Gleichung zu berechnende

Gleichgewichtspotential gibt bei Übereinstimmung mit der Steuerspannung Aufschluss über die permeierenden Ionen, vorausgesetzt, die Ionenverteilungen sind so, dass sie zu ungleichen Werten für die einzelnen Gleichgewichtspotentiale führen. Führt die Konzentrationsänderung eines Ions in der Badlösung zu einer Veränderung des Umkehrpotentials, sind die entsprechenden Ionen am Kanalstrom beteiligt. Eine weitere Form der *Patch-Clamp*-Technik ist die Ganzzellenanordnung (Hamill et al. 1981). Nach Ausbildung einer *Cell-Attached* –Konfiguration führt ein kräftiger Unterdruck an der *Patch*-Pipette zum Durchbruch der Membran innerhalb des *Patch*. Wenn dabei der direkte Kontakt zwischen Zelle und Pipette erhalten bleibt, ermöglicht ein niedriger elektrischer Widerstand zwischen *Patch*-Pipette und Zellinnerem die Messung der Membranströme über die gesamte Plasmamembran und die darin befindlichen Ionenkanäle. Die Ganzzellenanordnung wird im Rahmen der *Patch-Clamp*-Technik am häufigsten angewendet, da sie Aufschluss über eine Vielzahl von Ionenkanälen geben kann. Wie bei der *Inside-Out*-Konfiguration sind die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran definiert. Die Membranströme können durch Analyse des Umkehrpotentials charakterisiert werden. Die Modifikation der Badlösung ermöglicht die Untersuchung von Ionenkanälen, die durch extrazelluläre Substanzen gesteuert sind.

4.2. Natriumkanäle

4.2.1. Nomenklatur und Einteilung

4.2.1.1. Nomenklatur nach Isoformen

In spannungssensitiven Natriumkanälen ist eine α -Untereinheit gewebespezifisch mit einer oder zwei β -Untereinheiten assoziiert (Catterall 1993; Isom et al. 1994). Die Natriumselektivität und Spannungssensitivität sind durch die α -Untereinheiten determiniert, während die β -Untereinheiten

modulierend auf die Kinetik des Aktivierungs- und Inaktivierungsverhaltens wirken.

Es gelang 1980 erstmals, in Axonen des Zitteraals *Electrophorus electricus* die α -Untereinheit zu isolieren (Agnew et al. 1980). In weiteren Untersuchungen wurden unter Anwendung von elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden zahlreiche Isoformen der α -Untereinheit nachgewiesen. Dabei wurden bis vor wenigen Jahren drei unterschiedliche Familien angenommen (Goldin 1999). Untersuchungen über die phylogenetische Entwicklung der Isoformen (Goldin 2001) führten zur Kenntnis einer einzigen großen Familie spannungssensitiver Natriumkanalisoformen, die mit $\text{Na}_v 1.x$ bezeichnet wird. Die Nomenklatur orientiert sich an der bereits für Kalium- und Kalziumkanäle entwickelten Nomenklatur, nach der ein Kanal entsprechend dem bevorzugten Ion (Na), des Steuerungsmechanismus (*voltage*), der Familie (1) und der Isoform (.x) bezeichnet wird (Chandy 1991; Ertel et al. 2000; Goldin et al. 2000).

Die Unterscheidung der Isoformen gründet sich auf Unterschiede in der primären Aminosäuresequenz der α -Untereinheit (Goldin et al. 2000; Goldin 2001). Eine atypische Isoform, die zunächst für eine gliaspezifische Isoform der spannungssensitiven Natriumkanäle angesehen wurde (Gautron et al. 1992), zeigt in ihrer Primärsequenz deutliche Unterschiede in einer gerade für die Charakteristik eines spannungssensitiven Natriumkanals spezifischen Region. Es wurde gefunden, daß es sich bei dieser, bisher mit Na_x bezeichneten Isoform um einen wahrscheinlich durch Änderung der extrazellulären Natriumkonzentration gesteuerten Kanal handelt, der für die Regulation des Wasserhaushalts und der Natriumkonzentration bedeutsam ist (Watanabe et al. 2000; Hiyama et al. 2002).

4.2.1.2. Einteilung nach funktionellen Gesichtspunkten

Neben der an den Unterschieden der Primärstruktur der α -Untereinheit definierten strukturellen Einteilung ergeben sich weitere Eigenschaften spannungssensitiver Natriumkanäle als Einteilungskriterium.

⇒ Unterschiedliche Affinität zum Tetrodotoxin (TTX), dem Gift des Kugelfisches, die zur Unterscheidung in TTX-sensitive und TTX-insensitive

spannungsabhängige Natriumkanalisoformen geführt hat. Die drei TTX-resistenten Isoformen Na v1.5, Na v 1.8 und Na v 1.9 liegen auf Chromosom 3 (Plummer und Meisler 1999) und exprimieren eine unterschiedliche Aminosäuresequenz im P-Segment der α -Untereinheit (Terlau et al. 1991). Isoform Na v1.7, Na v1.8 und Na v 1.9 dominieren im peripheren Nervensystem und sind bis auf Na v1.7 TTX-resistent (Klugbauer et al. 1995; Sangameswaran et al. 1997; Ogata et al. 2000). Die im ZNS vorherrschenden Isoformen Na v1.1, Na v1.2, Na v1.3 und Na v1.6 sind TTX sensitiv (Suzuki et al. 1988; Chahine et al. 1994; Smith und Goldin 1998; Ogata and Ohishi 2002). Im Muskel ist Na v1.4 TTX-sensitiv und Na v1.7 TTX-resistent (Gellens et al. 1992; Chahine et al. 1994).

⇒ Unterschiedliche Spannungssensitivität:

Der strukturell in den stark positiv geladenen S4-Segmenten befindliche Spannungssensor (Noda et al. 1984) ist in der atypischen Isoform weniger positiv geladen und führt deshalb im Rahmen der Kanalaktivierung nach Spannungsänderung zu einer weniger ausgeprägten Konformationsänderung (Gautron et al. 1992; Ogata und Ohishi 2002).

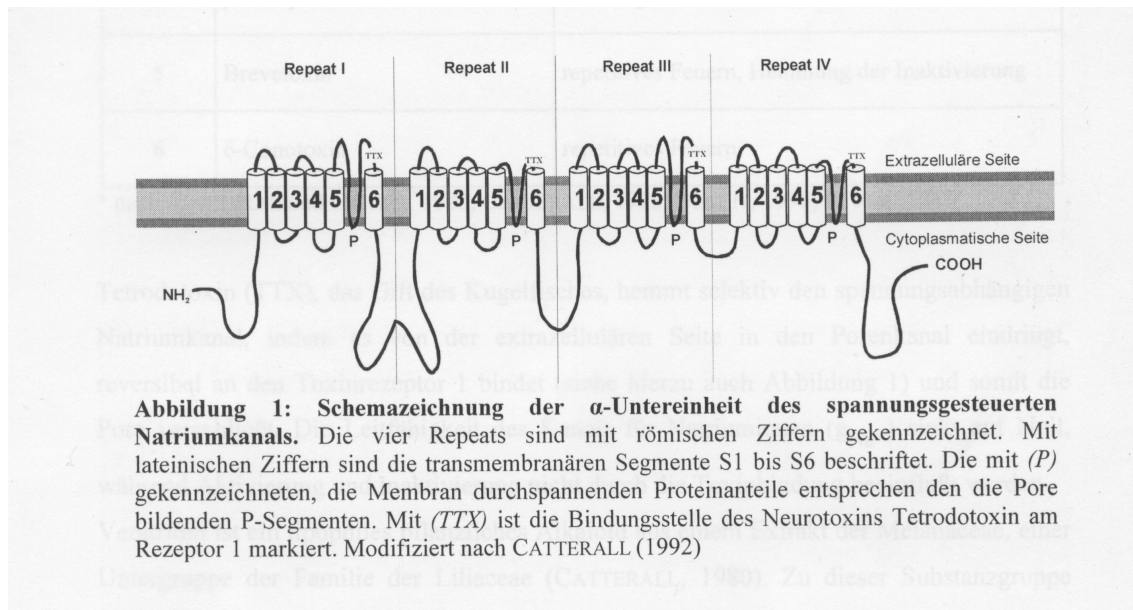
⇒ Verteilung und Regulation der Expression

Die spannungssensitiven Natriumkanäle können hinsichtlich ihres Vorkommens in Geweben in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Isoformen Na v1.1, Na v1.2, Na v1.3 und Na v 1.6 dominieren im ZNS und werden in Neuronen und Gliazellen exprimiert (Black et al. 1994 a; Black et al. 1994 b; Oh, et al. 1994). Isoform Na v1.4 und Na v1.5 herrschen im Muskel vor, Na v1.7, Na v1.8 und Na v1.9 in den Zellen des peripheren Nervensystems (Goldin 2001) und die atypische Isoform Na x unter anderem im Herzmuskel, Uterus, Astrozyten (Gautron et al. 1992) sowie periventrikulären Neuronen und Ependymzellen (Watanabe et al. 2000). Die Regulation der Expression hängt von der Lokalisation des Kanals in der Zelle und vom Differenzierungsgrad der Zelle ab.

4.2.2. Struktur

Der spannungsgesteuerte Natriumkanal ist ein transmembranäres Protein und besteht aus einer 280 kDa schweren α -Untereinheit (Glycoprotein von 1800-2000 Aminosäuren) und zwei β -Untereinheiten (Catterall 2000). Die β -

Untereinheiten wirken regulierend auf die Kanalöffnung, modulieren die Spannungsabhängigkeit der Porenkinetik, regulieren das Ausmaß der Kanalexpression in der Plasmamembran und haben eine Funktion als Zelladhäsionsmoleküle (Isom 2002). Ionenselektivität und Spannungssensitivität sind an die α -Untereinheit gebunden. Das Protein besteht aus vier homologen Aminosäuresequenzen, als Domäne oder Repeats I, II, III, IV bezeichnet (Abb.1).



Jedes der Repeats besteht aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6), welche durch Zwischensequenzen miteinander verbunden sind. Die besonders lange Zwischensequenz zwischen den Segmenten S5 und S6 wird als P-Segment bezeichnet. Ihm wird die Ionenselektivität des Kanals zugeschrieben (Brammar und Conley 1999). Bei Faltung des Proteins bilden die vier Repeats die Pore des Kanals (Marban et al. 1998; Catterall 2000; Denac et al. 2000; Goldin 2001; Yu und Catterall 2003), die von den P-Segmenten der vier Repeats ausgekleidet wird (Yellen et al. 1991). Die innere Porenöffnung bilden die S 6-Segmente (Yu und Catterall 2003). Die stark positiv geladenen S 4-Segmente bilden den Spannungssensor (Noda et al. 1984). Spannungsänderungen führen zu einer Konformationsänderung des Moleküls und zur Öffnung des Kanals.

4.2.3. Funktion der spannungsgesteuerten Natriumkanäle

4.2.3.1. Funktion in Neuronen und Muskelzellen

In Neuronen und Muskelzellen ermöglichen spannungssensitive Natriumkanäle die Erzeugung und Weiterleitung von Aktionspotentialen. Durch eine initiale Depolarisierung der Zellmembran ausgehend vom Ruhepotential über den Schwellenwert wird der spannungsabhängige Natriumkanal aktiviert, und es erfolgt ein dem Konzentrationsgefälle folgender schneller Einstrom von Natriumionen aus dem Extra- in den Intrazellulärraum. Dieser Ionenstrom führt an der Zellmembran zu einer Depolarisation bis in den positiven Bereich. Zunahme der Kalium- und Abnahme der Natriumleitfähigkeit bewirken eine Re- und Hyperpolarisation über das Ruhepotential hinaus bis in den positiven Bereich. Diese Vorgänge charakterisieren die drei Zustände des Kanalproteins : ruhend, aktiviert und inaktiviert, wobei der ruhende Zustand von der inaktivierten Phase durch die Nichtaktivierbarkeit in letzterer unterschieden wird (Marban et al. 1998; Denac et al. 2000; Goldin 2001).

4.2.3.2. Spannungsabhängige Natriumkanäle in Gliazellen

Die Funktion spannungssensitiver Natriumkanäle in Gliazellen ist weiterhin unklar und Gegenstand der Forschung (Sontheimer et al. 1996). Hypothesen zur Bedeutung der Kanäle beziehen sich auf eine mögliche Syntheseleistung an Natriumkanälen für benachbarte Neuronen (Sontheimer et al. 1996), obwohl auch gezeigt wurde, daß ein direkter Kontakt für die axonale Anreicherung von spannungssensitiven Natriumkanälen nicht notwendig ist (Deerinck et al. 1997). Eine andere Hypothese stellt die Bedeutung des Ruhestroms durch die spannungssensitiven Natriumkanäle der Gliazellen für den Erhalt der neuronalen Erregbarkeit heraus. Ein intrazellulärer Konzentrationsanstieg von Natriumionen steigert die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase-Aktivität und verhindert so eine zu hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration (Sontheimer et al. 1994 b).

4.2.4. Ionenkanäle in Tumoren

Für biologische Verhaltensmerkmale verschiedener Tumorentitäten wie Proliferation, Malignität und Motilität von Tumorzellen wurden Zusammenhänge zur Expression von Ionenkanälen gefunden. Für die Gruppe der Kaliumkanäle wurde ein Zusammenhang zwischen Kanalexpression und Proliferationstendenz des untersuchten Tumors gefunden (Wang et al. 2002). Im Vergleich von schwach und stark metastasierenden Zelllinien des Prostatakarzinoms der Ratte wurde nach Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanäle insbesondere in Zelllinien des schwach metastasierenden Prostatakarzinoms eine Proliferationshemmung gefunden (Fraser et al. 2000). Basrai et al.(2002) fanden nach Kaliumkanalblockade eine Hemmung der kaliuminduzierten Proliferation von Astrozyten. Weitere Untersuchungen existieren zum kleinzelligen Bronchialkarzinom (Pancrazio et al. 1989), Leberzellkarzinom (Zhou et al. 2003) und Kolonkarzinom (Abdul und Hoosein 2002a). Eine Hemmung der Tumorzellmotilität fanden Kraft et al. (2003) nach Aktivierung von Kaliumkanälen (Kraft et al. 2003). Für Gliome wurde auch eine Korrelation zwischen biologischer Wertigkeit und Kaliumkanalexpression gezeigt (Preussat et al. 2003). Der ursächliche Zusammenhang zwischen Kaliumkanalexpression, Proliferation und Motilität ist jedoch unklar. Unterstellt man einen Einfluß des Membranpotentials auf die Eigenschaften der Tumorzelle, rücken auch andere Ionenkanäle in das Betrachtungsfeld. So wurde eine Reduktion der Invasivität von menschlichen Prostatakarzinomzellen nach Natriumkanalblockade gefunden (Laniado et al. 1997), hingegen führte die Öffnung der Natriumkanäle durch Veratridin zu einer Proliferationshemmung bei stark und schwach metastasierenden Zelllinien des Rattenprostatakarzinoms (Fraser et al. 2000).

4.2.4.1. Spannungssensitive Natriumkanäle in Gliomen

Die Existenz spannungsabhängiger Natriumkanäle in Astrozyten ist in der Literatur beschrieben (Oh et al. 1994; Schaller et al. 1995). Auch in Gliomzellen wurden spannungssensitive Natriumkanäle nachgewiesen, in einer Dichte, die für meßbare Potentiale unter Laborbedingungen ausreichend ist (Patt et al. 1996; Labrakakis et al. 1997; Bordey und Sontheimer 1998). Die Funktion der

Kanäle ist unklar. Ein möglicher Einfluß auf die Motilität der Tumorzellen wird in dieser Arbeit untersucht.

4.2.5. Grundlagen der Beeinflussung von Natriumkanälen

Die Blockade oder dauerhafte Öffnung spannungssensitiver Natriumkanäle im Experiment ermöglicht Einblicke in ihre Funktion. Neurotoxine wie Tetrodotoxin, das Gift des japanischen Kugelfisches, binden mit hoher Affinität an einen von derzeit sechs bekannten Toxinrezeptoren der α -Untereinheit (Li et al. 2001) und ändern die Durchlässigkeit und die Öffnungs- und Schließ Eigenschaften des Kanals. Tabelle 1 zeigt in Übersicht die wichtigsten Toxine und deren Wirkung.

Tabelle 1 Toxinrezeptoren des spannungsabhängigen Natriumkanals und die wichtigsten Toxine

Rezeptor	Toxin	Wirkung
1	Tetrodotoxin, Saxotoxin, μ -Conotoxin	Senkung der Natriumleitfähigkeit
2	Veratridin, Batrachotoxin, Aconitin	Persistierende Öffnung
3	α –Scorpiontoxin	Hemmung der Inaktivierung
4	β –Scorpiontoxin	Senkung des Aktivierungspotentials
5	Brevetoxin	Repetitives Feuern, Hemmung der Inaktivierung
6	δ –Conotoxin	Repetitives Feuern

nach CATTERALL und GAINER 1985, CATTERALL 1992, BENOIT 1998, LI et al. 2001

In der vorliegenden Arbeit wurden Tetrodotoxin und Veratridin zur Modifikation der spannungsabhängigen Natriumkanäle eingesetzt. Tetrodotoxin dringt von extrazellulär in die Pore ein, bindet am Toxinrezeptor und verschließt die Pore. Veratridin ist ein pflanzliches Alkaloid, welches neben Cevadin und Veratramin in der pflanzlichen Droge Veratrum album enthalten ist (Hauschild 1973). Zu dieser Gruppe gehören auch Aconitin, Batrachotoxin, Grayanotoxin und verschiedene Insektizide (Caterall 1980). Veratridin bindet sich mit unterschiedlicher Affinität an zwei unterschiedlichen Stellen an der Innenseite

des Natriumkanals (Kusaka und Sperelakis 1994). Die Bindungsstelle mit hoher Affinität führt zu einer Senkung des Spitzenstromes, während die Bindung an den Rezeptor mit niedriger Affinität zu einer Erhöhung des *steady-state*-Stromes und des Schlußstromes führt (Kusaka und Sperelakis 1994). Mit der Bindung an den geöffneten Kanal verhindert Veratridin die Inaktivierung, gleichbedeutend mit einer dauerhaften Öffnung und Erhöhung der Leitfähigkeit. Der Vorgang ist durch TTX reversibel.

4.3. Induktion von Natriumkanälen durch Serumentzug und NGF

4.3.1. Was ist NGF?

Wachstumsfaktoren sind bedeutsam für die Kommunikation zwischen Zellen während ihrer Entwicklung und Funktion im Organverband (Westphal und Herrmann 1989). Einteilungsprinzipien sind Wirkung, Herkunft und Zielgewebe. Es wurden Proteine isoliert, denen Bedeutung für die Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems zukommt, die sogenannten Neutrophine (Hamburger 1993; Korsching 1993; Snider 1994; Bibel und Barde 2000). Das Neurotrophin 1 ist der Nerve Growth Factor (NGF), einer von sechs bekannten, in ihrer Aminosäuresequenz ähnlichen Wachstumsfaktoren mit Wirkung auf das Nervensystem. Die Wirkungsvermittlung erfolgt über die trk-Tyrosinkinase-Rezeptoren und den p75-Rezeptor (Chao 1992; Bothwell 1995). Hauptwirkung der Wachstumsfaktorbindung an trk-Rezeptoren ist die Verhinderung des programmierten neuronalen Zelltodes während der Entwicklung des peripheren Nervensystems (Kaplan und Miller 1997). Der p75-Rezeptor gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF). Trk-abhängig beeinflusst p75 das Ligandenprofil der trk-Rezeptoren (Bibel et al. 1999). Für eine maximale Neurotrophinwirkung müssen beide Rezeptortypen an den Zielzellen vorhanden sein (Bredesen und Rabizadeh 1997). Trk-unabhängig induziert p75 die Apoptose. NGF als Ligand für p75 erhöht die Apoptoserate an

p75-exprimierenden Zellen (Frade et al. 1996; Bredesen et al. 1998). Rabizadeh et al.(1999) und Wang et al.(2000) berichten hingegen über eine ligandenunabhängige Apoptoseinduktion (Rabizadeh et al. 1999; Wang et al. 2000). Die alleinige Expression von p75 steigert schon die Apoptoserate, die durch Behandlung mit NGF gesenkt werden kann.

4.3.2. Wirkung auf Gliazellen und Gliome

Gabe von NGF bewirkt in Gliazellen eine Steigerung der p75-Rezeptorenexpression sowie eine Veränderung der Morphe von Astrozyten in der Kultur (Hutton et al. 1992; Hutton und Perez-Polo 1995).

In Gliomzelllinien wurden neben anderen Wachstumsfaktoren auch Neurotrophine gefunden (Hamel et al. 1993; Washiyama et al. 1996; Kokunai et al. 1999). Tornatore et al. (1997) vermuten die Neurotrophinproduktion auch in vivo (Tornatore et al. 1997). Für die in unseren Versuchen verwendete humane Astrozytomzelllinie 1321N1 ist die Sekretion von NGF neben weiteren Wachstumsfaktoren nachgewiesen (Obara et al. 1998; Obara et al. 1999). Für die häufig untersuchte Gliomzelllinie 172 A ist die NGF-Produktion ebenfalls nachgewiesen (Hamel et al. 1993). Gliome exprimieren auch entsprechende Wachstumsrezeptoren (Watanabe et al. 1999). Die Rezeptorexpression ist insgesamt variabel und unterscheidet sich von Zelllinie zu Zelllinie und von Tumor zu Tumor, woraus sich auch die unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Wirkungen von Wachstumsfaktoren auf Gliomzellen erklären (Vinores und Koestner 1980; Cheng et al. 1994).

Der Einfluß von Neurotrophinen auf die mitotische Aktivität von Astrozytomzellen ist untersucht worden (Vinores und Koestner 1980; Marushige et al. 1992; Cheng et al. 1994; Dobrowsky et al. 1994; Tanaka und Koike 1997; Singer et al. 1999; Watanabe et al. 1999). Die teils gegensätzliche Wirkung von NGF auf Proliferation und Apoptose wird in der Literatur mit trk A- und p75 vermittelter Rezeptorwirkung erklärt. Durch trk-A-Rezeptoren wird ein zellwachstumhemmendes Signal erzeugt (Marushige et al. 1992; Pflug et al. 2001). Die Hemmung der Proliferation geht nicht mit einer Erhöhung der Apoptoserate einher (Pflug et al. 2001). Vinores und Köstner (1980) interpretierten den nur kurz anhaltenden proliferationshemmenden Effekt von

NGF auf Gliome mit einer möglichen Heterogenität der Gliomzellen bei der Expression von Neurotrophinrezeptoren.

Eine Proliferationssteigerung im Zusammenhang mit trk-A-Rezeptoren fanden u.a. Yoon et al.(1998) und Singer et al. (1999) (Yoon et al. 1998; Singer et al. 1999). In den von ihnen untersuchten Zellen wurden aber auch p75-Rezeptoren exprimiert. Das zahlenmäßige Verhältnis der Neurotrophinrezeptoren untereinander soll entscheidend für die NGF-Wirkung sein (Bredesen und Rabizadeh 1997; Kaplan und Miller 1997). Singer et al.(1999) fanden unter NGF-Einwirkung auf Gliomzelllinien langsam und schnell proliferierende Zellen nebeneinander. Die nur den p75-Neurotrophinrezeptor exprimierenden Gliomzellen zeigten unter NGF-Einwirkung keine Änderung der Proliferations- oder Apoptoserate (Hamel et al. 1993; Pflug et al. 2001).

4.3.3. Serumentzug

Durch serumfreies Kulturmedium ließ sich in der Phäochromozytomzelllinie PC12 die NGF-Synthese steigern (Gill et al. 1998; Kumano et al. 2000). Bei drei Glioblastomzelllinien wurde eine Steigerung der NGF-Produktion nach Serumentzug beobachtet (Singer et al. 1999). Kraft et al. (2001) fanden bei der Untersuchung der Zelllinie 1321N1 unter Serumentzug eine Veränderung der Morphe der Gliomzellen von einem fibroblastenähnlichen Aussehen, anhaltend bis 2 Tage nach Beginn der Serumdeprivation, zum Aussprossen langer dünner Zellfortsätze und einer Rundung des Zellkörpers bei fortgesetztem Serumentzug. Zusatz von 100 ng/ml NGF zur serumdeprivierten Zellkultur förderte das Erscheinen rundlicher Zellen. Während dreizehntägiger Serumdeprivation sank die Zahl fibroblastenähnlicher Zellen kontinuierlich, und die Zellen zeigten im Vergleich zu serumkultivierten Ansätzen eine signifikant reduzierte Proliferation (Kraft et al. 2001).

Neben der morphologischen Veränderung zeigte sich unter Serumentzug und NGF die Exprimierung spannungsabhängiger Natriumkanäle in Gliomzellen der Linie 1321N1 und 172A. TTX blockierte die Natriumkanäle sowohl in NGF-behandelten als auch nur unter Serumentzug angesetzten Zellen der Linie 1321N1. Die Expression von Natriumkanälen wuchs mit der Dauer der Serumdeprivation, NGF beschleunigte diesen Effekt. Außerdem wurde eine

Modifikation des *Gating* der spannungsabhängigen Natriumkanäle in der Linie 1321N1 unter NGF-Einwirkung bei Serumdeprivation von mehr als 6 Tagen gefunden. Dabei fand sich insbesondere unter NGF-Einfluß, mehr als nur bei Serumentzug allein, eine beschleunigte Inaktivierung der Kanäle bei 1321N1 und sowohl die *steady-state*-Inaktivierung als auch die Stromstärke-Spannungsbeziehung verschoben sich zu mehr negativen Potentialen. In 172 A-Zellen fanden sich die Effekte bereits nach kurzer Serumdeprivation unabhängig von der Anwesenheit von NGF (Kraft et al. 2001).

In der vorliegenden Untersuchung wurden Zellkulturen der Linie 1321 N1 der Serumdeprivation mit und ohne Zugabe von NGF ausgesetzt. Unterstellt wurde die Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen wie von Kraft et al. (2001) unter gleichartigen experimentellen Bedingungen nachgewiesen, untersucht wurde ein möglicher Einfluß auf die Motilität der Zellen.

5. Ziele der Arbeit

Gliomzellen in situ exprimieren spannungsabhängige Natriumkanäle. Die Bedeutung dieser Kanäle ist unklar. Ausgehend von Befunden an Prostatakarzinomzelllinien wäre eine mögliche Bedeutung ihr Einfluß auf die Migration der Tumorzelle. Unter in vitro-Bedingungen verlieren die Gliomzellen die Eigenschaft der Natriumkanalexpression (Kraft et al. 2001), so dass native Zelllinien zum Studium der Wirkung der Natriumkanalmodulation auf Tumorzelleigenschaften nicht verwendbar sind. Es wurden deshalb Gliomzellen in vitro (1321N1 Zellen) mittels Serumentzug und/oder NGF-Gabe zur Kanalinduktion veranlasst. Anschließend wurden die Natriumkanäle mit TTX blockiert und mit Veratridin aktiviert. In der Boydenkammer wurde der Einfluß der Natriumkanalmodulation auf die Migration der Zellen untersucht.

6. Material und Methode

6.1. Zellkultur

Gliomzellen der Zelllinie 1321N1 wurden von der Europäischen Sammlung für Zellkulturen (Salisbury, G.B.) eingeführt. Die Zellen wurden in 5 ml Kulturflaschen (Greiner, Deutschland) mit Modifiziertem Essentiellem Medium (MEM) kultiviert. Das Medium enthielt Earles Salz,(Gewebekulturmedium, welches in variablen Anteilen Kalziumchlorid, Magnesiumsulfat , Kaliumchlorid und Natriumhydrogencarbonat enthält), L-Glutamin, 10% Fetales Kälberserum und 1% Gramicidin. Eine Erneuerung des Kulturmediums erfolgte alle 48 Stunden. Die Kulturen wurden bei 37 Grad Celsius und 100% Luftfeuchte und einer atmosphärischen CO₂-Konzentration von 5% gehalten. Zur Untersuchung wurden 25 000 oder 50 000 Zellen ausgesät.

6.2. Boyden-Kammer

Die Boydenkammer (Costar Corporation Cambrigde, U.S.A.) ist eine Platte mit 24 durchsichtigen Plastikkammern, diese haben jeweils einen herausnehmbaren Einsatz, der oben offen, etwas kürzer als die Kammer tief und an seiner Unterseite mit einer porenhaltigen, 0,5 cm durchmessenden Membran verschlossen ist. In Abb. 2 ist im Aufriß und in einer Prinzipskizze der Aufbau dieser Versuchsanordnung gezeigt.

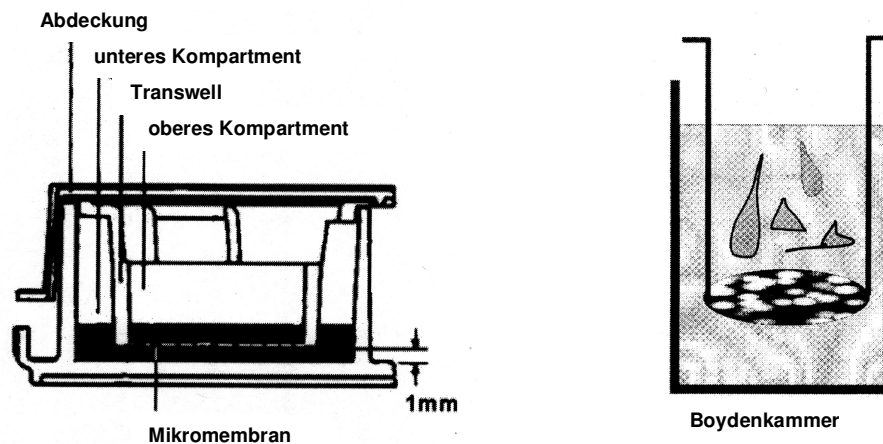


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Boydenkammer der Firma Costar Corporation

Die offenen Poren haben einen Durchmesser von 8 μm . Sie sind an der Oberfläche glatt umrandet und auf der Unterseite der Membran etwas unregelmäßig begrenzt (Abb.3).

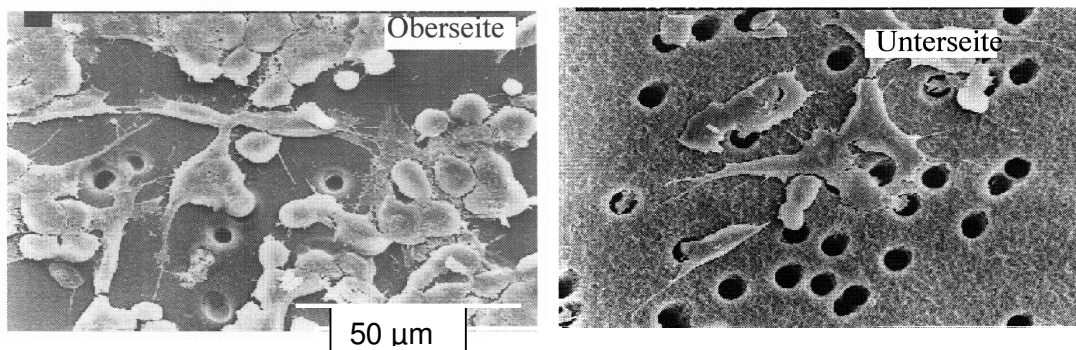


Abb. 3: Porenstruktur der Membran der Boydenkammer mit Gliomzellen - Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme

Dieses ermöglicht an Hand der Schärfentiefe die Unterscheidung der Membranober- oder Unterseite beim Auszählen im Mikroskop und damit eine Unterscheidung der durch die Poren migrierten Zellen von den auf der Oberfläche verbliebenen Zellen. Nach Befüllung der Kammer mit dem Medium entsteht durch die Membran ein oberes und unteres Kompartiment. In das obere Kompartiment werden die Zellen hineingegeben, welche auf der Porenmembran anhaften, in der Versuchszeit durch die Poren hindurchwandern und sich auf der Unterseite anheften. Abb. 4 zeigt eine durch eine Pore hindurchwandernde Gliomzelle.

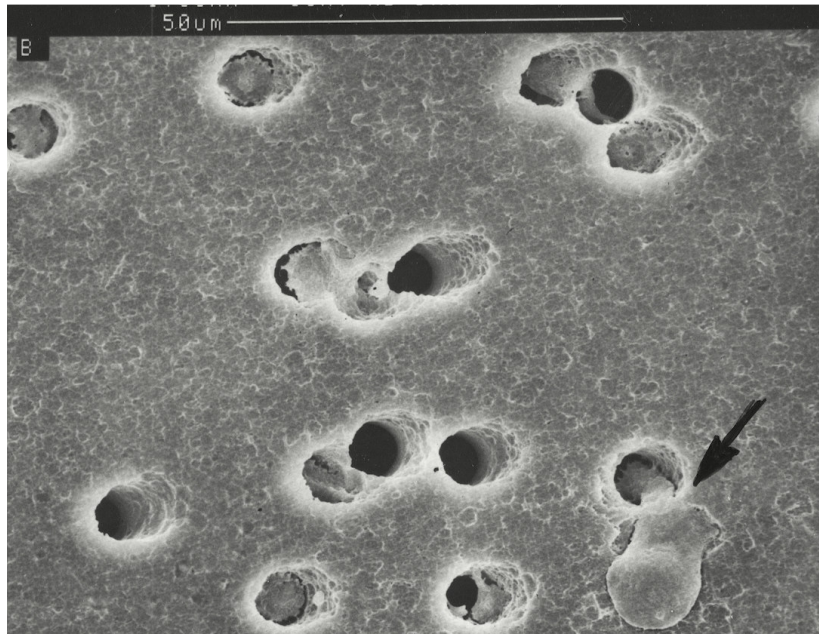


Abb. 4: Gliomzelle beim Austritt aus der Pore - Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr.G.Neupert, Institut für Pathologie der FSU Jena zur Verfügung gestellt, daher ist die Methode der Rasterelektronenmikroskopie hier nicht beschrieben. Mit dem Ende des Versuchs wurde der Einsatz aus der Kammer entnommen und die Porenmembran mit den anheftenden Zellen vom Einsatz durch Herausschneiden mit dem Skalpell abgelöst. Entsprechend dem Versuchsziel wurden die oberen Zellen abgewischt oder belassen. Die Membran mit den anhaftenden Zellen wurde anschließend auf einem Filterpapier luftgetrocknet. Anschließend wurden sie mit Methylenblau gefärbt, mit Aquadest abgespült und mit der Oberseite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mit Eukitt als Dauerpräparat eingedeckt. Anschließend konnte die Auszählung beginnen.

6.3. Versuchsanordnung und -ausführung

In 3 Serien wurden Gliomzellen nach Serumentzug zur Natriumkanalinduktion veranlasst.

Nach 6 oder 8 Tagen gelangten die Zellen in die Boydenkammer, wobei die Kanäle durch Tetrodotoxin (TTX) 100 nmol (Rose et al. 1997; Wlasak 2004) blockiert oder nach Veratridinzusatz von 50 µmol bzw. 100 µmol (Kusaka und Sperelakis 1994; Rose et al. 1997; Wlasak 2004) geöffnet wurden. Ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Substanzen diente dem Ausschluss einer Beeinflussung von Migration oder Proliferation durch die Substanzen selbst. Am folgenden Tag wurden die Membranen der Kammer an der Oberseite abgewischt und gefärbt.

In einer vierten Serie wurden Gliomzellen ohne Kanalinduktion den Testsubstanzen ausgesetzt. Gezählt wurden an einem Mikroskop der Firma ZEISS mit 40iger Objektiv (entspricht vierhundertfacher Vergrößerung) an der Oberseite abgewischte Membranen um die Zahl durchgewanderter Zellen zu ermitteln.

Für jede Versuchsbedingung innerhalb der 4 Serien wurden 9 Zählwerte ermittelt, das heißt 3 Objektträger mit anhaftenden Zellen pro Ansatz (entspricht einem unabhängigen Durchgang), insgesamt 3 unabhängige Durchgänge.

Nachdem sich ein Einfluss von NGF auf die Proliferation abzeichnete, wurden die Serien 2 und 3, Aussaat von 50 000 Zellen, ohne und mit NGF-Zusatz, mit jeweils 3 Auszählungen für alle Versuchsbedingungen wiederholt, wobei hier die Oberseiten der Membranen **nicht** abgewischt und so die Gesamtzellzahl ermittelt wurde.

6.3.1. Serie 1: 25 000 Zellen Aussaat. Thema: Natriumkanalinduktion durch Serumentzug, Motilität nach TTX und Veratridin

Mit Serum angesetzte Zellen (25 000, Tag -1) wurden einem Serumentzug ausgesetzt (Tag 0). Mit Einbringen in die Boydenkammer (Tag 6) erfolgte die Zugabe von jeweils 100 nmol TTX, 50 µmol Veratridin, 100 µmol Veratridin sowie ohne Substanzzusatz für die Kontrollgruppe. Abwischen der Membranoberseite sowie Färben erfolgten am Tag 7 beim zweiten und dritten Ansatz der Serie 1. Beim ersten Ansatz gelangten die Zellen am Tag 8 in die Boydenkammer und wurden am Tag 9 gefärbt.

6.3.2. Serie 2: 50 000 Zellen Aussaat. Thema:
Natriumkanalinduktion durch Serumentzug, Migration nach
TTX und Veratridin.

Mit Serum angesetzte Zellen (50 000, Tag -1) wurden einem Serumentzug ausgesetzt (Tag 0). Am Tag 6 wurden die Zellen jeweils mit 100 nmol TTX, 50 µmol Veratridin, 100 µmol Veratridin sowie einmal ohne Substanzzusatz versehen in die Boydenkammer gebracht, am siebenten Tag dann die Membranoberseiten abgewischt und gefärbt.

6.3.3. Serie 3: 50 000 Zellen Aussaat. Thema:
Natriumkanalinduktion durch Serumentzug und Gabe von
NGF, Migration nach TTX und Veratridin.

Mit Serum angesetzte Zellen (50 000, Tag -1) wurden einem Serumentzug ausgesetzt und erhielten am Tag 0 100 ng/ml NGF. In die Boydenkammer gelangten die Zellen am Tag 6 unter Zugabe von jeweils 100 nmol TTX, 50 µmol Veratridin, 100 µmol Veratridin. Abwischen der Membranoberseite und Färbung erfolgten am Tag 7.

6.3.4. Serie 4: 50 000 Zellen Aussaat. Thema: mit Serum, ohne
Kanalinduktion, Motilität nach TTX und Veratridin.
Überprüfung eines direkten Einflusses von TTX und
Veratridin auf die Migration der Zellen ohne
Natriumkanalinduktion.

Mit Serum angesetzte Zellen (Tag -1) erhielten am Tag 0 bis auf die ohne Substanzzusatz verbleibende Kontrollgruppe jeweils 100 nmol TTX, 50 µmol Veratridin und 100 µmol Veratridin. Am Tag 1 wurden die Membranoberseiten abgewischt und die durchgewanderten Zellen gefärbt.

6.3.5. Wiederholung Serie 2 : 50 000 Zellen Aussaat. Zellen an Membranober- und -unterseite belassen. Thema: Einfluss von NGF auf die Proliferation, hier ohne NGF

Mit Serum angesetzte Zellen (50 000 Tag -1), wurden einem Serumentzug ausgesetzt (Tag 0). Nach sechs Tagen wurden die Zellen jeweils mit 100 nmol TTX, 50 µmol Veratridin und 100 µmol Veratridin versehen und in die Boydenkammer überführt, einschließlich einer Kontrolle ohne Substanzzusatz. Am siebten Tag erfolgte die Färbung, die Membranoberseiten wurden nicht abgewischt.

6.3.6. Wiederholung Serie 3: 50 000 Zellen Aussaat. Zellen an Membranober- und -unterseite belassen. Thema: Einfluß von NGF auf die Proliferation, hier mit NGF

Mit Serum angesetzte Zellen (50 000, Tag -1) erhielten Serumentzug und gleichzeitig jeweils 100 ng/ml NGF (Tag 0). Am sechsten Tag gelangten die Zellen in die Boydenkammer, wurden jeweils mit 100 nmol TTX, 50 µmol Veratridin und 100 µmol Veratridin versetzt bis auf die substanzfreie Kontrollgruppe. Am siebten Tag wurden die Zellen gefärbt, ohne dass die Membranoberseiten abgewischt wurden.

6.4. Versuchsauswertung

6.4.1. Zellzählung

In den Serien 1 bis 4 wurden die durch die Perforationen der Membran in der Boydenkammer durchgewanderten Zellen im Mikroskop gezählt. Dabei wurde auf jedem Objektträger eine repräsentative Auswahl von 5 Zählfeldern getroffen, innerhalb derer die durchgewanderten Zellen numerisch erfasst wurden. Die Zahlen der 5 Zählfelder wurden addiert . In dieser Form wurden für

Serie 1 (25 000 Zellen ausgesät) im Versuch Kontrollgruppe (ohne Substanzzugabe), im Versuch TTX-Zusatz , im Versuch Veratridin 50µmol, im Versuch Veratridin 100 µmol pro Ansatz 3 Deckgläschen, d.h. 3 Zählwerte ermittelt. Bei insgesamt 3 Ansätzen ergaben sich so 9 Zählwerte für durch die Poren der Membran gewanderte Zellen. Aus diesen 9 Werten wurden Durchschnitt und Standardabweichung errechnet und graphisch aufgetragen. Gleiches Vorgehen galt für Serie2 (50 00 Zellen), Serie 3 (50 000 Zellen plus NGF) sowie Serie 4 (ohne Kanalinduktion). Bei der Wiederholung der Serie 2 und 3 zur Überprüfung des Einflusses von NGF auf die Proliferation wurde für die Anordnungen Kontrolle, TTX, V 50 und V 100 jeweils ein Ansatz mit je 3 Zählwerten ausgeführt.

6.4.2. Statistik

Die statistische Auswertung der durch Auszählung ermittelten Zellzahlen erfolgte in 4 Gruppen entsprechend den 4 Versuchen Kontrolle, TTX, V50, V100 zu je 4 Serien (25 000 Zellen, 50 000 Zellen, 50 000 Zellen plus NGF, 50 000 Zellen ohne Kanalinduktion) mittels Statistikprogramm SPSS. Laut Verteilungsprüfung waren die Daten in den einzelnen Serien und Gruppen als nicht normalverteilt anzusehen (Shapiro-Wilk-Test). Zur Auswertung wurde deshalb der U-Test von Mann und Whitney gewählt. Ob die Testergebnisse signifikante Unterschiede zeigen, ergibt sich aus der exakten Signifikanz, dem p-Wert des sogenannten exakten U-Tests, der für kleine Stichproben geeignet ist. Ist dieser Wert kleiner als 0.05, liegt für den betreffenden Vergleich ein signifikanter Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% vor.

7. Ergebnisse

Grafisch dargestellt in Abbildung 5 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Anzahl der durch die Poren der Membran gewanderten Zellen für die Versuchsbedingungen:

- Kontrolle (ohne Substanzzusatz)
- TTX 100 nmol
- Veratridin 50µMol
- Veratridin 100µMol,

welche aus 9 Werten je Versuchsbedingung errechnet wurden(siehe Tab.2-5).

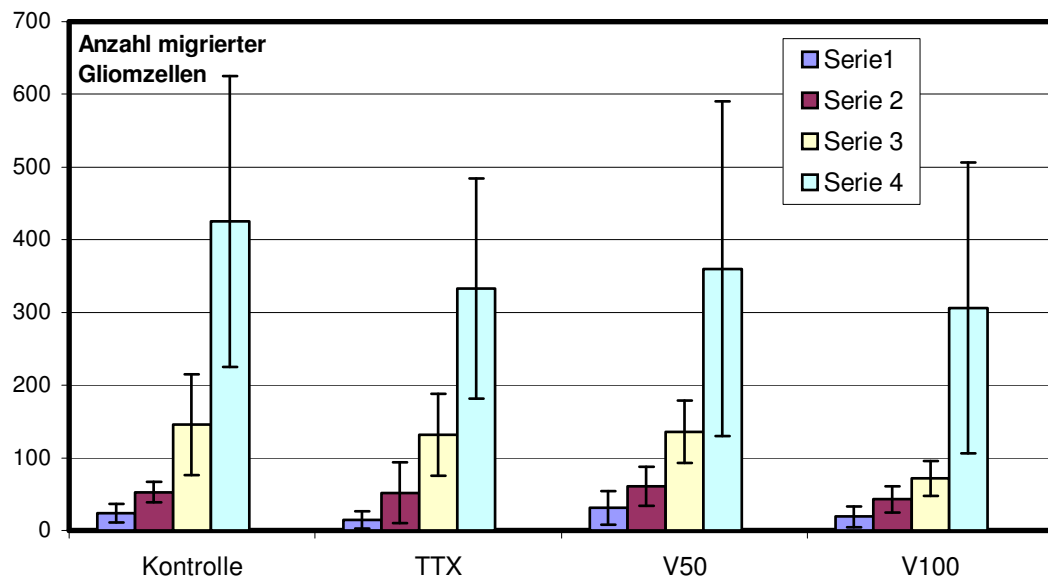


Abb. 5: Zusammengefaßte Darstellung der Anzahl gewanderter Zellen

Serie 1: 25000 Zellen ausgesät

Serie 2: 50000 Zellen ausgesät

Serie 3: 50000 Zellen ausgesät + NGF

Serie 4: 50000 Zellen ausgesät, ohne Kanalinduktion

7.1. Serie 1: 25 000 Zellen Aussaat.

Thema: Natriumkanalinduktion durch Serumentzug,

Motilität nach TTX und Veratridin.

Die ermittelten Zählwerte für gewanderte Zellen sind in der Tabelle 2 für 9 Versuche in 3 Ansätzen dargestellt, entsprechend den blauvioletten Säulen in Abbildung 5. In der Kontrollgruppe ohne Substanzzugabe, mit Blockade der Natriumkanäle mit TTX, sowie Öffnung der Natriumkanäle mit Veratridin 50µmol und 100 µmol ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellmigration ($p > 0.05$). Somit war kein Einfluß der Natriumkanäle auf die Migration nachweisbar.

Serie 1: 25 000 Zellen Kontrolle					Serie 1: 25 000 Zellen TTX			
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz 1	A	25	23.8± 12.5		Ansatz 1	A	2	14.6± 11.9
	B	7				B	6	
	C	5				C	8	
Ansatz 2	A	29			Ansatz 2	A	21	
	B	27				B	31	
	C	28				C	36	
Ansatz 3	A	35			Ansatz 3	A	9	
	B	43				B	10	
	C	16				C	9	
Σ 215					Σ 132			

(wird fortgesetzt)

Serie 1: 25 000 Zellen V 50					Serie 1: 25 000 Zellen V 100			
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz 1	A	1	30.5± 23.2		Ansatz 1	A	7	19± 13.8
	B	5				B	1	
	C	12				C	4	
Ansatz 2	A	43			Ansatz 2	A	33	
	B	66				B	34	
	C	59				C	28	
Ansatz 3	A	24			Ansatz 3	A	24	
	B	23				B	8	
	C	42				C	32	
Σ 275					Σ 171			

Tabelle 2 : Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung durch die Poren der Membran gewanderter Zellen, entspricht den violetten Säulen in Abb.5

7.2. Serie 2: 50 000 Zellen Aussaat.

Thema: Natriumkanalinduktion durch Serumentzug,,

Motilität nach TTX und Veratridin.

Die ermittelten Zählwerte für durchgewanderte Zellen in 9 Versuchen zu 3 Ansätzen zeigt Tabelle 3, entsprechend den weinroten Säulen in Abbildung 5. Kontrollgruppe ohne modulierende Substanzen, TTX, Veratridin 50 µmol und 100 µmol zeigten hinsichtlich der Migration keinen signifikanten Unterschied, ($p > 0.05$). Da mehr Zellen als in Serie 1 ausgesät wurden, war auch die Zahl gewanderter Zellen in allen Versuchsanordnungen signifikant größer. ($p < 0.014$). Blockade oder Öffnung der Natriumkanäle hat keinen Einfluß auf das Migrationsverhalten der Gliomzellen.

Serie 2: 50 000 Zellen Kontrolle					Serie 2: 50 000 Zellen TTX			
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz 1	A	22	52.8± 23.8		Ansatz 1	A	20	52.1± 42
	B	31				B	26	
	C	61				C	14	
Ansatz 2	A	54			Ansatz 2	A	25	
	B	29				B	32	
	C	45				C	46	
Ansatz 3	A	71			Ansatz 3	A	100	
	B	96				B	70	
	C	67				C	36	
Σ 476					Σ 369			

Serie 2: 50 000 Zellen V 50					Serie 2: 50 000 Zellen V 100				
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ	
Ansatz 1	A	102	61.1± 26.9		Ansatz 1	A	30	42.6± 17.7	
	B	58				B	27		
	C	17				C	57		
Ansatz 2	A	66			Ansatz 2	A	35		
	B	31				B	37		
	C	57				C	31		
Ansatz 3	A	70			Ansatz 3	A	76		
	B	94				B	29		
	C	55				C	62		
Σ 550					Σ 384				

Tabelle 3: Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung durch die Poren der Membran gewanderter Zellen, entspricht den weinroten Säulen in Abb. 5

7.3. Serie 3: 50 000 Zellen Aussaat.

Thema: Natriumkanalinduktion durch Serumentzug und NGF-Zusatz. Motilität nach TTX und Veratridin.

Die in 9 Versuchen zu 3 Ansätzen ermittelten Zählwerte sind in der Tabelle 4 dargestellt, entsprechend den elfenbeinfarbenen Diagrammsäulen in Abb.5. Kontrollgruppe, TTX, Veratridin 50 μmol und 100 μmol zeigten keinen signifikanten Unterschied.($p>0.05$). Die Zahlen lagen aber signifikant höher als in der Serie 2 ohne NGF-Zusatz ($p\ 0.011$). Auch mit NGF-Zugabe zeigten die Natriumkanäle keinen Einfluß auf die Migration.

Serie 3: 50 000 Zellen+NGF Kontrolle				Serie 3: 50 000 Zellen+NGF TTX					
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ	
Ansatz 1	A	63	146± 69.3		Ansatz 1	A	87	132± 56.1	
	B	43				B	56		
	C	64				C	59		
Ansatz 2	A	170			Ansatz 2	A	175		
	B	199				B	204		
	C	188				C	135		
Ansatz 3	A	163			Ansatz 3	A	129		
	B	215				B	202		
	C	209				C	141		
Σ 1314					Σ 1188				

(wird fortgesetzt)

Serie 3: 50 000 Zellen+NGF V 50					Serie 3: 50 000 Zellen+NGF V 100			
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz 1	A	90	136,3± 42.8		Ansatz 1	A	45	72± 24.2
	B	92				B	44	
	C	96				C	53	
Ansatz 2	A	123			Ansatz 2	A	90	
	B	178				B	51	
	C	116				C	86	
Ansatz 3	A	206			Ansatz 3	A	89	
	B	151				B	111	
	C	175				C	79	
Σ 1227					Σ 648			

Tabelle 4: Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung durch die Poren der Membran gewanderter Zellen, entspricht den elfenbeinfarbenen Säulen in Abb. 5

7.4. Serie 4: 50 000 Zellen Aussaat.

Thema: mit Serum, ohne Kanalinduktion, Motilität nach TTX und Veratridin Überprüfung eines direkten Einflusses von TTX und Veratridin auf die Migration der Zellen ohne Natriumkanalinduktion.

Die in 9 Versuchen zu 3 Ansätzen ermittelten Zahlen durchgewanderter Zellen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt, entsprechend den hellblauen Säulen in Abb. 5. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$). Somit hatten die kanalmodulierenden Substanzen TTX und Veratridin keinen eigenen Einfluß auf die Motilität der Gliomzellen.

Serie 4: 50 000 Zellen ohne Kanalinduktion Kontrolle				Serie 4: 50 000 Zellen ohne Kanalinduktion TTX			
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ		Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz 1	A	140	425.5± 198.9	Ansatz 1	A	169	333.1± 151.2
	B	167			B	243	
	C	281			C	183	
Ansatz 2	A	637		Ansatz 2	A	492	
	B	635			B	530	
	C	654			C	549	
Ansatz 3	A	400		Ansatz 3	A	335	
	B	457			B	264	
	C	495			C	233	
Σ 3866				Σ 2998			

Serie 4: 50 000 Zellen ohne Kanalinduktion V 50				Serie 4: 50 000 Zellen ohne Kanalinduktion V 100			
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ		Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz 1	A	115	359.4± 229.6	Ansatz 1	A	255	305.8± 200
	B	157			B	134	
	C	250			C	138	
Ansatz 2	A	675		Ansatz 2	A	544	
	B	631			B	559	
	C	669			C	599	
Ansatz 3	A	227		Ansatz 3	A	174	
	B	234			B	148	
	C	277			C	202	
Σ 3235				Σ 2753			

Tabelle 5: Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung durch die Poren der Membran gewanderter Zellen, entspricht den hellblauen Säulen in Abb. 5

7.5. Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Aussaat. Zellen an Membranober- und Unterseite belassen.

Thema: Einfluß von NGF auf die Proliferation, hier: ohne NGF.

Es wurden für jede Versuchsbedingung (Kontrollgruppe ohne Substanz, TTX, Veratridin 50 µmol, 100 µmol) 3 Zahlenwerte ermittelt, die in der Tabelle 6 dargestellt sind, entsprechend den weinroten Säulen in Abb. 6.

Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: ohne NGF - Kontrolle				Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: ohne NGF - TTX				
	Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt-träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz	A	172	156.6± 15		Ansatz	A	116	188.3± 36.3
	B	142				B	312	
	C	156				C	137	
Σ 470					Σ 2753			

Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: ohne NGF – V 50				Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: ohne NGF – V 100				
	Objekt- träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt- träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz	A	352	343.3± 65.4		Ansatz	A	494	358.3± 134
	B	404				B	226	
	C	274				C	355	
Σ 1030					Σ 1075			

Tabelle 6: Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung an Membranober- und Unterseite anhaftender Zellen, entspricht den weinroten Säulen in Abb. 6

7.6. Wiederholung Serie 3: 50 000 Zellen Aussaat. Zellen an Membranober- und Unterseite belassen.

**Thema: Einfluß von NGF auf die Proliferation,
hier: mit NGF**

Für die Kontrollgruppe, TTX, Veratridin 50 µmol und 100 µmol wurden 3 Zahlenwerte ermittelt, die in der Tabelle 7 dargestellt sind, entsprechend den elfenbeinfarbenen Säulen in Abb. 6.

Wie schon unter 7.3 und 7.2 beobachtet, zeichnete sich bei Zugabe von NGF eine erhöhte Proliferation ab, allerdings waren die Unterschiede in der Wiederholung des Versuchs in 7.5 und 7.6 nicht signifikant (Kontrolle: p 0.1, TTX p 0.7, V50 p 0.1 und V100 p 0.2).

Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: mit NGF - Kontrolle				Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: mit NGF - TTX				
	Objekt- träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt- träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz	A	189	370.3± 171		Ansatz	A	367	249.3± 126
	B	393				B	117	
	C	529				C	264	
Σ 1111					Σ 748			

(wird fortgesetzt)

Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: mit NGF – V 50				Wiederholung Serie 2: 50 000 Zellen Einfluss von NGF auf Proliferation, hier: mit NGF – V 100				
	Objekt- träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ			Objekt- träger	Anzahl migr. Zellen	Mittelwert ± σ
Ansatz	A	425	434.6± 15.8		Ansatz	A	663	531.6± 118
	B	453				B	433	
	C	426				C	499	
Σ 1304					Σ 1595			

Tabelle 7: Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung an Membranober- und Unterseite anhaftender Zellen, entspricht den elfenbeinfarbenen Säulen in Abb. 6

Grafisch dargestellt in Abbildung 6 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Gesamtzellzahl auf der Membranober- und –unterseite für die Versuchsbedingungen:

- Kontrolle (ohne Substanzzusatz)
- TTX 100 nmol
- Veratridin 50µMol
- Veratridin 100µMol,

ohne und mit NGF-Zusatz, welche aus jeweils 3 Werten je Versuchsbedingung errechnet wurden (siehe Tab. 6 und 7).

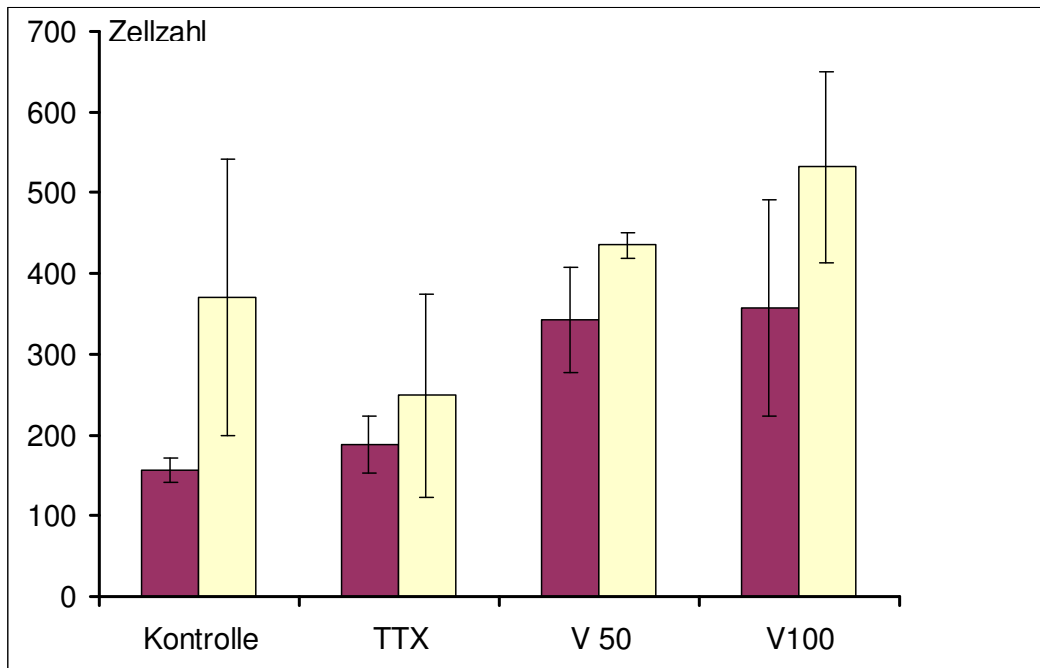


Abb. 6: Gesamtzellzahl auf der Ober- und Unterseite der Membran in Abhängigkeit von NGF-Zusatz (weinrot: ohne NGF, elfenbeinfarben: mit NGF)

7.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in den Gliomzellen der Linie 1321N1 durch Serumentzug und NGF induzierten Natriumkanäle haben auf die Motilität der Zellen, erfasst an Hand ihres Migrationsverhaltens, keinen Einfluß, wie durch Blockade mittels TTX und Öffnung der Kanäle mittels Veratridin zu sehen war.

Da unter NGF-Zugabe unabhängig von der Natriumkanalmodulation signifikant mehr Zellen wanderten, wurde ein Einfluß von NGF auf die Proliferation vermutet. In der Wiederholung der Serie 2 und 3 wurden auf beiden Seiten der Membran mehr Zellen nach NGF-Zugabe gezählt, allerdings war die Signifikanz wegen der zu kleinen Stichprobe statistisch nicht zu sichern.

Serumentzug führt zum Untergang von Zellen, weshalb im Ansatz der Serie 4 mit Serum ohne Deprivation in allen Versuchen die meisten Zellen gezählt wurden.

8. Diskussion

8.1. Die Rolle spannungsgesteuerter Natriumkanäle für die Migration

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war die Modulation von spannungsabhängigen Natriumkanälen in Gliomzellen der Zelllinie 1321 N1 mittels Veratridin und Tetrodotoxin in der Boydenkammer um einen möglichen Einfluß der Natriumkanäle auf die Migration der Zellen herauszufinden. Ausgangspunkt für diese Überlegung waren Untersuchungen von Fraser et al. (1999) und Laniado et al. (1997), die einen Zusammenhang zwischen Metastasierungsfähigkeit von Prostatakarzinomzellen der Ratte bzw. des Menschen und der Expressierung von TTX-sensitiven Natriumkanälen erbrachten (Laniado et al. 1997; Fraser et al. 1999). Natriumkanalexprimierende Zellen waren zur Metastasierung fähig und verloren diese Fähigkeit bei Blockade mit 600 nmol TTX. Smith et al. (1998) übertrugen die natriumkanalkodierende DNS auf nichtinvasive Zellen, welche nach erfolgreicher Transduktion ein metastasierendes Verhalten erkennen ließen (Smith et al. 1998). Diese Ergebnisse sprechen für eine Bedeutung spannungsabhängiger Natriumkanäle für die Metastasierung von Prostatakarzinomzellen. Motilität von Tumorzellen ist bedeutsam für die Metastasierung, weil die Zellen von ihrer primären Lokalisation intra- oder extravasal migrieren und in Zielgewebe eindringen müssen, um Tochtergeschwülste zu erzeugen (Djamgoz, et al. 2001). Untersuchungen haben eine strenge Korrelation zwischen Zellmotilität, definiert durch Membranverformung, Ausbildung von Podozyten, Zelltranslokation und dem Metastasierungspotential ergeben (Mohler, et al. 1987). Tumorzellen reagieren mit Motilität auf zahlreiche externe Faktoren einschließlich Komponenten der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren oder chemotaktische Faktoren. Verschiedene bewegliche Zellen, von der Protozoe bis zur Säugetierzelle reagieren auf ein extern appliziertes gerichtetes elektrisches Feld mit einem

Richtungswechsel ihrer Bewegung (Djamgoz, et al. 2001). Djamgoz et al. (2001) zeigten durch Modulation spannungsabhängiger Natriumkanäle, wie sie in der stark metastasierenden MAT-LyLu-Zelllinie exprimiert werden, dass die Galvanotaxis, die gerichtete Bewegung im elektrischen Feld, durch TTX unterdrückt und durch Veratridin gesteigert werden konnte und schlußfolgerten auf diesem Wege die Kontrolle der Galvanotaxis durch spannungsabhängige Natriumkanäle bei dieser Zelllinie.

In der vorliegenden Arbeit war der Untersuchungsparameter die Migration. Die Invasion wurde nicht getestet, dazu wäre es notwendig gewesen, die Poren der Membran in der Boydenkammer mit einer Substanz zu kitten, welche die Zellen hätten überwinden müssen, um durchwandern zu können.

Untersucht wurde nur die Zelllinie 1321N1, von der nachgewiesen wurde, dass sie spannungsabhängige Natriumkanäle nach Serumentzug in ausreichender Dichte exprimiert (Kraft et al. 2001).

Wir haben weder durch Blockade noch durch Öffnung der Kanäle einen Effekt auf die Migration der Gliomzellen dieser Zelllinie gefunden.

Wlasak (2004) fand bei der Blockade spannungsgesteuerter Natriumkanäle an humanen Neuroblastomzellen der Zelllinie SH-SY5Y keinen Einfluß auf die Proliferation und die Migration, eine Aktivierung der Kanäle mit Veratridin bewirkte eine Hemmung beider Prozesse, die jedoch bei simultaner Applikation des antagonisierenden TTX ebenfalls auftraten, so dass der Veratridineffekt nicht auf die Natriumkanalmodulation zurückgeführt wurde (Wlasak 2004).

8.1.1. Mögliche Bedeutung der Natriumkanalblockade für Migration von 1321 N1

Bei Blockade der Natriumkanäle mit 100 nmol Tetrodotoxin ergab sich kein signifikanter Einfluss auf die Migration der Zellen. Die hohe Standardabweichung sehen wir als Folge der kleinen Anzahl von Messwerten. Ein toxischer Effekt auf die Zellen selbst kann bei dieser Dosierung ausgeschlossen werden. Kraft et al. (2001) blockierten mit 300 nMol TTX, Laniado et al. (1997) setzten 600 nMol TTX ein, Brismar und Collins (1989) erreichten bei 200 nMol eine fast vollständige Blockade der Kanäle (Brismar

und Collins 1989) und Sontheimer (1994) beobachtete erst bei prolongierter Exposition mit 100 μMol TTX den Tod von Astrozyten (Sontheimer 1994 a).

Ein fehlender TTX-Effekt wäre neben einer zu geringen Substanzkonzentration auch durch eine zu geringe Kanaldichte oder fehlende TTX –Sensitivität zu erklären. Kraft et al. (2001) wiesen in 1321 N1 nach Serumentzug eine ausreichend hohe Dichte an TTX-sensitiven Kanälen nach. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Modulation der Natriumkanäle erfüllt waren.

Serumentzug und NGF haben ausreichend spannungsabhängige Natriumkanäle induziert. Die gewählten Substanzkonzentrationen waren zur Kanalmodulation geeignet und die Substanzen wurden unter den Laborbedingungen nicht inaktiviert.

In der Literatur werden toxische, protektive und fehlende Effekte nach Tetrodotoxingabe beschrieben. Ling et al. (1991) schilderten bezüglich der cytotoxischen Tetrodotoxinwirkung eine Verkürzung der Überlebenszeit und Reduktion der Spontanaktivität von Thalamuszellen der Ratte (Ling et al. 1991). Xie et al. (1994) beobachteten nach Applikation von 10 μMol TTX eine Erhöhung der Überlebensrate bei ischämiegeschädigten Rattenhirnen (Xie et al. 1994). Kleinhaus und Prichard (1983) fanden bei Neuronen von Blutegeln weder toxische noch protektive Effekte (Kleinhaus und Prichard 1983).

8.1.2. Mögliche Bedeutung der Natriumkanalaktivierung für die Migration von 1321N1

In der vorgelegten Studie ergab sich kein messbarer Einfluss auf die Migration durch Veratridin. Auch bei sofortiger Applikation des Toxins bei Aussaat der Zellen in die Boydenkammer um in der Migrationsstudie den Proliferationseffekt möglichst auszuschalten, zeigte sich gegenüber der substanzfreien Kontrollgruppe kein Unterschied. Für die hohen Standardabweichungen gilt das schon im vorangestellten Abschnitt Gesagte.

Für das Zellgift Veratridin wurden dosisabhängig toxische und protektive Effekte beschrieben. Koike et al. (2000) fanden bei Veratridinapplikation zwischen 1 bis 100 μMol einen dosisabhängigen toxischen Effekt, der bis 20 μMol durch Tetrodotoxin antagonisierbar war (Koike et al. 2000). Tanaka und Koike (1997)

beobachteten an Zellkulturen von Ganglienzellen des oberen Zervikalmarks von Ratten eine Verzögerung des apoptotischen Zelltodes nach Serumentzug beim Einsatz von 0.25 μMol Veratridin bis 0.75 μMol und führten den zellprotektiven Effekt auf den Natriumeinstrom über spannungsabhängige Natriumkanäle zurück. Dieser Effekt war jedoch an frisch gewonnenen Ganglienzellen nicht zu erheben. Erst beim Einsatz von 2 μMol war der protektive Effekt von Veratridin auch bei frischen, nicht in der Zellkultur angesetzten Zellen nachweisbar, wurde hierbei aber auf einen Kalziumeinstrom zurückgeführt (Tanaka und Koike 1997). Bei eingesetzten Mengen zwischen 3 bis 10 μMol induziert Veratridin durch die Natriumkanalaktivierung einen Kalziumeinstrom in Neuroblastom- und andere Zellen (Pauwels et al. 1990). Unter bestimmten Bedingungen können in Anwesenheit von Veratridin sowohl Natrium- als auch Kalziumionen die Natriumkanäle passieren (Pauwels et al. 1991).

Veratridin hat eine blockierende Wirkung auf Kaliumkanäle (Verheugen et al. 1994; Knutson et al. 1997). Als Folge der Kaliumkanalblockade wurde eine Hemmung der Proliferation beobachtet (Dubois und Rouzaire-Dubois 1993), (Wonderlin und Strobl 1996; Basrai et al. 2002).

Während TTX ein spezifischer Kanalblocker ist, wirkt Veratridin nicht nur auf Natriumkanäle. In dieser einen, von uns untersuchten Zelllinie hat sowohl die Modulation von Natriumkanälen als auch die möglicherweise stattgefunden Beeinflussung von Kalium- oder anderen Kanälen keinen Effekt gezeigt.

Schrey et al. (2002) fanden bei molekularbiologischen Untersuchungen von Operationspräparaten eine differenzierte Expressierung von Natriumkanälen in Gliomen in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad. Gliome niedriger Malignität exprimieren ein größeres Spektrum an Natriumkanalisoformen als maligne Gliome, wobei auch deren Anzahl mit der Malignität abnahm. Der Autor schlussfolgerte, dass die in anderen Tumoren für spannungssensitive Natriumkanäle beobachtete malignitätsfördernde Eigenschaft einer gesteigerten Invasivität auf Gliome nicht übertragbar ist (Schrey et al. 2002).

Allerdings wurden in unserer Studie Natriumkanäle induziert und dennoch zeigte sich kein Effekt. Da bei Schrey et al. (2002) die native Expression besonders in niedriggradigen Gliomen nachgewiesen wurde, sind diese Befunde einerseits nicht ohne Einschränkung vergleichbar, da die 1321N1 Zelllinie von einem höhergradigen Gliom stammt. Andererseits wäre

perspektivisch von Interesse, ob Primärkulturen von niedriggradigen Astrozytomen, bei denen man die Natriumkanalexpression in Kultur ebenfalls zunächst sichern müsste, durch Natriumkanalblockade hinsichtlich der Migration ein anderes Verhalten zeigen als bei der 1321N1-Zelllinie oder nicht. Primärkulturen von niedriggradigen Astrozytomen sind schwer zu erzielen und zu erhalten.

NGF hat die Proliferation angeregt. Das war zu erwarten. Da NGF auch zur Induktion von Natriumkanälen eingesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es die Dichte an Natriumkanälen erhöht hat, dennoch hat sich kein Effekt auf die Migration gezeigt, was unseren Negativbefund unterstreicht.

8.2. Bedeutung von Ionenkanälen für die Proliferation von Zellen

Die zelluläre Proliferation als Hauptkomponente des Wachstums von Tumoren ist mit zahlreichen intrazellulären Signalen verbunden. Im einzelnen sind intrazelluläre Konzentration von Kalzium-, Wasserstoff-, Natrium- und Kaliumionen als bedeutungsvoll für den Ablauf des Zellzyklus bekannt (Pardee 1989). Obwohl die genauen Mechanismen nicht vollständig geklärt sind, scheint die Änderung der Permeabilität für Ionen zum Übergang der Zellen von der Ruhe- zur Mitosephase beizutragen (Grinstein und Dixon 1989).

Die intrazelluläre Ionenkonzentration wird durch verschiedene Transportmechanismen der Zellmembran kontrolliert, wie Natrium-Kalium-Pumpe, Natrium-Wasserstoff-Ionenaustauscher, Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter und die signalvermittelte intrazelluläre Kalziumfreisetzung. Es wurde gezeigt, dass Ionenkanäle eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Wachstum und Proliferation spielen (Dubois und Rouzaire-Dubois 1993; Nilius und Droogmans 1994; Wonderlin und Strobl 1996; Rane 1999; Ullrich 1999).

Neben Entstehung und Fortleitung von Aktionspotentialen kann die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration weitere Vorgänge in der Zelle auslösen, die mit dem Energiehaushalt und dem Zellzyklus in Zusammenhang stehen.

Von Metcalfe et al. (1986) wurden der Natrium-Wasserstoffionen-Austauscher, der Natrium-Hydrogencarbonat-Kotransporter und der Hydrogencarbonat-Chlorid-Austauscher als transmembranäre Transportsysteme erkannt, die ihre Energie aus dem Natriumkonzentrationsgradienten schöpfen (Metcalfe et al. 1986). Eine Verringerung des Gradienten kann zu einer Änderung des intrazellulären pH-Wertes führen (Lagarde und Pouyssegur 1986; Mendoza 1988; Durand et al. 1993).

Ein durch erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration verursachter Abfall des pH-Wertes führt zum Wegfall der Triggerung der DNS-Synthese (Binggeli und Weinstein 1986), so dass eine hohe Natriumkonzentration einen antiproliferativen Effekt bewirken könnte. Ein weiterer Weg ist die über die pH-Wert-Änderung induzierte Beeinflussung der Phosphorylierung von Zellproteinen und damit ihres Aktivierungszustandes (Lagarde und Pouyssegur 1986, Durand et al. 1993; Koike et al. 2000). Davon sind auch Proteine betroffen, die für die DNS-Synthese erforderlich sind. Binggeli und Weinstein (1986) beschreiben DNS-Synthetasen, die durch hohe Natriumkonzentration entweder gehemmt oder aktiviert werden (Binggeli und Weinstein 1986).

Ein intrazellulärer Konzentrationsanstieg von Natrium steigert die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase (Sontheimer, et al. 1994 b), welche unter ATP-Verbrauch den Natrium- und Kalium-Gradienten zwischen Cytosol und Extrazellulärraum aufrecht erhält. Xie et al. (1994), wiesen nach, dass das für diesen Prozeß verbrauchte ATP nicht für andere energiebedürftige Vorgänge zur Verfügung steht, sowie die Tatsache, dass eine hohe Natriumkonzentration die Glykolyse hemmt und somit auch auf diese Weise zur Verringerung des Energieangebotes beiträgt (Xie et al. 1994). Die Folge wäre eine geringere Verfügbarkeit von energiereichen Substanzen für andere energiekonsumierende Prozesse wie beispielsweise die Motilität.

Eine gesteigerte intrazelluläre Natriumkonzentration führt zur vermehrten Bildung von Arachidonsäure aus membranären Phospholipiden. Die Arachidonsäure dient zur Synthese von Leucotrienen und Endoperoxiden und ist in der Zelle als Botenstoff von Bedeutung (Schmidt und Thews 1993).

Die Auslösung verschiedener energieverbrauchender Prozesse durch intrazellulären Natriumeinstrom läßt eine Beteiligung der Natriumkanäle an der Migration erwarten, was auch für die Gliomzelllinie 13231N1 zutrifft.

In unserer Untersuchung war das nicht so. Den Grund dafür können wir nicht angeben.

Um Aussagen zum Beitrag des Natriuminflusses über die Natriumkanäle zur Natriumhomöostase in der Zelle machen zu können, ermittelten Rose et al. (1997) die intrazelluläre Natriumkonzentration mittels fluoreszierender Natriumbindung an Benzofuran Isophtalat (Natrium-*Imaging*). Es wurden sternförmige und nicht sternförmige Astrozyten mit differenter Kanalausstattung unterschieden. Die Basiskonzentration war 8.5 mM intrazellulär und wurde durch 100 µM TTX nicht verändert. Öffnung der Kanäle mit 100 µM Veratridin bewirkte einen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration auf 47.1mM in 44% der sternförmigen und auf 9.7mM in 64% der nicht sternförmigen Astrozyten. Etwa 30% der Zellen reagierten auf Veratridin mit einer Verringerung der intrazellulären Natriumkonzentration um ca. 2 mM (Rose et al. 1997). Auch Koike et al. (2000) bestimmten die intrazelluläre Natriumkonzentration in Abhängigkeit von Veratridin und TTX und kamen zu vergleichbaren Ergebnissen (Koike et al. 2000).

Die Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration wurde in den Untersuchungen zu den Prostatakarzinomzelllinien nicht durchgeführt. Daher konnte auch kein Mechanismus angeboten werden, wie der Einfluss der Natriumkanalmodulation auf die Metastasierung realisiert wird. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass spannungsgesteuerte Kaliumkanäle bei den schwach metastasierenden in stärkerem Maße als bei den stark metastasierenden Zelllinien die Proliferation kontrollieren (Fraser et al. 2000).

Das Thema Natriumkanäle bei Tumoren ist schwierig zu untersuchen und bei verschiedenen Tumoren auch unterschiedlich relevant. Weitere Untersuchungen wären auf der Proteinebene denkbar, indem die Tumorzellen mit Natriumkanalantikörpern immunhistochemisch markiert werden, um Unterschiede in der Kanalexpression aufzuspüren, wie es mittels RT-PCR Schrey et al. (2002) gezeigt haben, diese aber zusätzlich zellulär aufzulösen.

Immunhistochemische Untersuchungen an Astrozytenkulturen neonataler Rattensehnerven gibt es von Sontheimer et al.(1991) und Minturn et al.(1992) (Sontheimer et al. 1991) (Minturn et al. 1992). England et al. (1996) fanden beim Menschen in posttraumatischen Neuromen mittels Radioimmunoassay eine signifikant höhere Dichte an Natriumkanälen als in normalen N.suralis-

Präparaten und erklärten damit eine axonale Übererregbarkeit als mögliche Ursache des Neuromschmerzes (England et. al. 1996). Love et al. (1991) nutzten einen monoklonalen Antikörper für spannungsabhängige Natriumkanäle der Ratte zur Erkennung eines Kanalproteins im menschlichen fetalen Hirn, Herz und Skelettmuskel der 14. bis 18. Gestationswoche (Love et al. 1991). Abdul und Hoosein (2002) bestätigten immunhistochemisch mit gegen Teile der α -Untereinheit der Natriumkanäle gerichteten Antikörpern die verstärkte Expressierung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen in Karzinomzellen gegenüber Normalzellen und deren Einbeziehung in das Tumorstadium (Abdul und Hoosein 2002 b).

Fraser et al. (2003) fügten ihren Untersuchungen zur Rolle von spannungsabhängigen Kalium- und Natriumkanälen bei Proliferation und Metastasierung der stark metastasierenden MAT-LyLu- und der schwach metastasierenden AT-2 Zelllinie des Rattenprostatakarzinoms eine Studie zur Motilität nach Blockade oder Öffnung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen hinzu, die insbesondere in der stark zur Metastasierung neigenden MAT-LyLu-Zelllinie exprimiert werden. Dabei senkte TTX ($1\mu\text{M}$) die Motilität in der stark metastasierenden Zelllinie um 47%. Veratridin ($20\mu\text{M}$) hatte in beiden Linien keinen Effekt, wie in unserer Untersuchung, aber Aconitin ($100\mu\text{M}$) und ATX II (25pM) steigerten die Motilität in der MAT-LyLu-Zelllinie um 15 und 9 % (Fraser et al. 2003).

In den Gliomen, bleibt die elektrophysiologisch und mit mRNA nachgewiesene Natriumkanalexpressierung hinsichtlich ihrer Funktion weiterhin unklar. Neben der möglicherweise für Gliomzellen gegenüber anderen Tumorentitäten geringeren Relevanz von Natriumkanälen für die Realisierung von malignen Eigenschaften wurde auch diskutiert, dass bei der Untersuchung von anderen Zelllinien oder Primärkulturen von Gliomen mit Modulation spannungsabhängiger Natriumkanäle doch ein Einfluss auf die Migration zu beobachten sein könnte. Das gilt auch für Untersuchungen, bei denen weitere Zellgifte zur Modulation der Kanäle eingesetzt werden.

9. Schlussfolgerungen

Entsprechend der Zielstellung der Arbeit kann gesagt werden, dass die Blockade und die Öffnung spannungssensitiver Natriumkanäle in Gliomzellen der Zelllinie 1321N1 keinen Einfluss auf die Migration hat.

Für weitere Untersuchungen zur Bedeutung spannungssensitiver Natriumkanäle für die Gliomzelle kommen neben anderen Zelllinien auch Primärkulturen, weitere kanalmodulierende Substanzen, die Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration sowie immunhistochemische Methoden in Betracht.

10. Literatur

Abdul, M. and Hoosein, N. (2002a). "Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer." Oncol Rep **9**(5): 961-4.

Abdul, M. and Hoosein, N. (2002b). "Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity." Anticancer Res **22**(3): 1727-30.

Agnew, W. S., Moore A.C., Levinson S.R., Raftery M.A (1980). "Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of *Electrophorus electricus*." Biochem Biophys Res Commun **92**(3): 860-6.

Basrai, D., Kraft, R., Bollensdorff, C., Liebmann, L., Benndorf, K., Patt, S.(2002). "BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells." Neuroreport **13**(4): 403-7.

Bibel, M. and Barde, Y. A. (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." Genes Dev **14**(23): 2919-37.

Bibel, M., Hoppe, E., Barde, (1999). "Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR." Embo J **18**(3): 616-22.

Binggeli, R. and Weinstein, R. C. (1986). "Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions." J Theor Biol **123**(4): 377-401.

Black, J. A., Yokoyama, S., Waxmann, S. G., Oh, Y., Zur, K. B., Sontheimer, H. (1994a). "Sodium channel mRNAs in cultured spinal cord astrocytes: in situ hybridization in identified cell types." Brain Res Mol Brain Res **23**(3): 235-45.

Black, J. A., Yokoyama, S., Higashida, H., Ransom, B. R., Waxmann, S. G. (1994b). "Sodium channel mRNAs I, II and III in the CNS: cell-specific expression." Brain Res Mol Brain Res **22**(1-4): 275-89.

Bordey, A. and Sontheimer, H. (1998). "Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells In situ: enigma of spiking glial cells." J Neurophysiol **79**(5): 2782-93.

Bothwell, M. (1995). "Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors." Annu Rev Neurosci **18**: 223-53.

- Brammar, W. J. and Conley, E. C. (1999). "The ion channel facts book IV-voltage gated channels." Academic press: 36-38; 768-838.
- Bredesen, D. E. and Rabizadeh, S. (1997). "p75NTR and apoptosis: Trk-dependent and Trk-independent effects." Trends Neurosci **20**(7): 287-90.
- Bredesen, D. E., Ye, X., Tasinato, A., Sperandio, S., Wang, J. J., Assa-Munt, N, Rabizadeh, S. (1998). "p75NTR and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die." Cell Death Differ **5**(5): 365-71.
- Brismar, T. (1995). "Physiology of transformed glial cells." Glia **15**(3): 231-43.
- Brismar, T. and Collins, V. P. (1989). "Potassium and sodium channels in human malignant glioma cells." Brain Res **480**(1-2): 259-67.
- Catterall, W. A. (1980). "Neurotoxin that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes." Ann Rev Pharmacol Toxicol **20**: 15-43.
- Catterall, W. A. (1993). "Structure and function of voltage-gated ion channels." Trends Neurosci **16**(12): 500-6.
- Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron **26**(1): 13-25.
- Chahine, M., Bennett, P.B., George, A. L. Jr., Horn, R. (1994). "Functional expression and properties of the human skeletal muscle sodium channel." Pflugers Arch **427**(1-2): 136-42.
- Chandy, K. G. (1991). "Simplified gene nomenclature." Nature **352**(6330): 26.
- Chao, M. V. (1992). "Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation." Neuron **9**(4): 583-93.
- Cheng, K., Sawamura, Y., Sakuma, S., Tada, M., Sudo, M., Aida, T. Abe, H. (1994). "Antiproliferative effect of tumor necrosis factor alpha on human glioblastoma cells linked with cell cycle arrest in G1-phase." Neurol Med Chir **34**: 274-278.
- Deerinck, T. J., Levinson, S. R., Bennett, G. V., Ellismann, M. H. (1997). "Clustering of voltage-sensitive sodium channels on axons is independent of direct Schwann cell contact in the dystrophic mouse." J Neurosci **17**(13): 5080-8.

- Denac, H., Mevissen, M., Scholtsyk, G. (2000). "Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **362**(6): 453-79.
- Djamgoz, M. B., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S. P., Korohoda, P. (2001). "Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na⁺ channel activity." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2697-705.
- Dobrowsky, R. T., Werner, M. H., Castellino, A. M. , Chao, M. V., Hannun, Y.A. (1994). "Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor." Science **265**(5178): 1596-9.
- Dubois, J. M. and Rouzaire-Dubois, B. (1993). "Role of potassium channels in mitogenesis." Prog Biophys Mol Biol **59**(1): 1-21.
- Durand, T., Gallis, J. L., Masson, S., Cozzzone, P. J., Canioni, P. (1993). "pH regulation in perfused rat liver: respective role of Na(+)-H⁺ exchanger and Na(+)-HCO₃⁻ cotransport." Am J Physiol **265**(1 Pt 1): G43-50.
- England, J. Happel, L. T., Kline, D. G., Gamboni, F., Thouron, L. C., Liu, Z. P., Levinson, S. R. (1996). "Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas." Neurology **47**: 272-276.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, P., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., Caterall, W. A. (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." Neuron **25**(3): 533-5.
- Frade, J. M., Rodriguez-Tebar, A., Barde, Y. A. (1996). "Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor." Nature **383**(6596): 166-8.
- Fraser, S., Ding, Y., Liu, A., Foster, C. S., Djamgoz, M.B. (1999). "Tetrodotoxin supresses morphological enhancement of the metastatic Mat-Ly-Lu rat prostate cancer cell line." Cell Tissue Res **259**: 505-512.
- Fraser, S. P., Grimes, J. A., Djamgoz, M. B. (2000). "Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines." Prostate **44**(1): 61-76.
- Fraser, S. P., Salvador, V., Manning, E. A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R. J., Djamgoz, M.B. (2003). "Contribution of functional voltage-gated Na⁺channel

expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility." J Cell Physiol. **195**(3): 479-478.

Gautron, S., Dos Santos, G., Pinto-Henrique, G., Koulakoff, A., Gros, F., Berwald-Netter, Y. (1992). "The glial voltage-gated sodium channel: cell- and tissue-specific mRNA expression." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7272-6.

Gellens, M. E., George, A. L. Jr., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., Kallen, R. G. (1992). "Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 554-8.

Gill, J. S., Schenone, A. E., Podratz, J. L., Windebank, A. J. (1998). "Autocrine regulation of neurite outgrowth from PC12 cells by nerve growth factor." Mol Brain Res **57**: 123-131.

Goldin, A. L. (1999). "Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels." Ann N Y Acad Sci **868**: 38-50.

Goldin, A. L. (2001). "Resurgence of sodium channel research." Annu Rev Physiol **63**: 871-94.

Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tankum, M. M., Waxmann, S. G., Wood, J. N., Catterall, W. A. (2000). "Nomenclature of voltage-gated sodium channels." Neuron **28**(2): 365-8.

Grinstein, S. and Dixon S. J. (1989). "Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation." Physiol Rev **69**(2): 417-81.

Hamburger, V. (1993). "The history of the discovery of the nerve growth factor." J Neurobiol **24**(7): 893-7.

Hamel, W., Westphal, M., Szonyi, E., Escandon, E., Nikolics, K. (1993). "Neurotrophin gene expression by cell lines derived from human gliomas." J Neurosci Res **34**(2): 147-57.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, B., Sakmann, B., Sigworth, F. J. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.

- Hauschild, F. (1973). Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. Leipzig, VEB Georg Thieme Verlag.
- Hiyama, T. Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M. M., Yoshida, S., Noda, M. (2002). "Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing." Nat Neurosci **5**(6): 511-2.
- Hutton, L. A., deVellis, J., Perez-Polo, J. R. (1992). "Expression of p75NGFR TrkA, and TrkB mRNA in rat C6 glioma and type I astrocyte cultures." J Neurosci Res **32**(3): 375-83.
- Hutton, L. A. and Perez-Polo, J. R. (1995). "In vitro glial responses to nerve growth factor." J Neurosci Res **41**(2): 185-96.
- Isom, L. L. (2002). "The role of sodium channels in cell adhesion." Front Biosci **7**: 12-23.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., Catterall, W. A. (1994). "Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels." Neuron **12**(6): 1183-94.
- Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (1997). "Signal transduction by the neurotrophin receptors." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 213-21.
- Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B. W., Burger, P. C. (1995). "Histopathology, classification, and grading of gliomas." Glia **15**(3): 211-21.
- Kleinhaus, A. L. and Prichard, J. W. (1983). "Differential action of tetrodotoxin on identified leech neurons." Comp Biochem Physiol C **74**(1): 211-8.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Flockerzi, V., Hofmann, F. (1995). "Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells." Embo J **14**(6): 1084-90.
- Knutson, P., Ghiani, C. A., Zhou, J. M., Gallo, V., Mc Bain, C. J. (1997). "K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells." J Neurosci **17**(8): 2669-82.
- Koike, T., Tanaka, S., Oda, T., Ninomiya, T. (2000). "Sodium overload through voltage-dependent Na⁽⁺⁾ channels induces necrosis and apoptosis of rat superior cervical ganglion cells in vitro." Brain Res Bull **51**(4): 345-55.

Kokunai, T., Iguchi, H., Tamaki, N. (1999). "Differentiation and growth inhibition of glioma cells induced by transfer of trk A proto-oncogene." J Neurooncol **42**(1): 23-34.

Korsching, S. (1993). "The neurotrophic factor concept: a reexamination." J Neurosci **13**(7): 2739-48.

Kraft, R., Basrai, D., Benndorf, K., Patt, S. (2001). "Serum deprivation and NGF induce and modulate voltage-gated Na(+) currents in human astrocytoma cell lines." Glia **34**(1): 59-67.

Kraft, R., Krause, P., Jung, S., Basrei, D., Liebmann, L., Bolz, J., Patt, S. (2003). "BK channel openers inhibit migration of human glioma cells." Pflugers Arch **446**(2): 248-55. Epub 2003 Feb 15.

Kraft, R. and Patt, S (2004). Patch-Clamp-Technik. Lehrbuch der Molekularen Biotechnik. Wink. Weinheim, Viley-VCH.

Kumano, T. Mutoh, T., Nakagawa, H., Kuriyama, M. (2000). "HMG-CoA reductase inhibitor induces a transient activation of high affinity nerve growth factor receptor, trk, and morphological differentiation with fatal outcome in PC12 cells." Brain Res **859**(1): 169-72.

Kusaka, M. and Sperelakis, N (1994). "Veratridine actions on two types of fast Na⁺ channels in human uterine leiomyosarcoma cells." European Journal of Pharmacology **271**: 387-393.

Labrakakis, C., Patt, S., Weydt, P., Cervos-Navarro, J., Meyer, R., Kettenmann, H. (1997). "Action potential-generating cells in human glioblastomas." J Neuropathol Exp Neurol **56**(3): 243-54.

Lagarde, A. E. and Pouyssegur, J. M. (1986). "The Na⁺:H⁺ antiport in cancer." Cancer Biochem Biophys **9**(1): 1-14.

Laniado, M. E., Lalani, E. N., Fraser, S. P., Grimes, J. A., Bhargal, B., Djamgoz, M. B., Abel, P. D. (1997). "Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro." Am J Pathol **150**(4): 1213-21.

Li, W. I., Berman, F. W., Okino, T., Yokokawa, F., Shioiri, T., Gerwick, W. H., Murray, T. F. (2001). "Antillatoxin is a marine cyanobacterial toxin that potently activates voltage-gated sodium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7599-604.

- Ling, D. S., Petroski, R. E., Geller, H. M. (1991). "Both survival and development of spontaneously active rat hypothalamic neurons in dissociated culture are dependent on membrane depolarization." Brain Res Dev Brain Res **59**(1): 99-103.
- Love, S., Bourne, S. P., Baines, D. (1991). "Immunochemical detection of sodium channel in human tissue and cell lines." Neuropathology and Applied Neurobiology **17**: 21-28.
- Marban, E., Yamagishi, T., Tomaselli, G. F. (1998). "Structure and function of voltage-gated sodium channels." J Physiol **508**(Pt 3): 647-57.
- Marushige, Y., Marushige, K., Koestner, A. (1992). "Growth inhibition of anaplastic glioma cells by nerve growth factor." Anticancer Res **12**(6B): 2069-73.
- Mendoza, S. A. (1988). "The role of ion transport in the regulation of cell proliferation." Pediatr Nephrol **2**(1): 118-23.
- Metcalf, J. C., Moore, J. P., Smith, G. A., Hesketh, T. R. (1986). "Calcium and cell proliferation." Br Med Bull **42**(4): 405-12.
- Minturn, J. E., Sontheimer, H., Black, J. A., Ransom, B. R., Waxmann, S. G. (1992). "Sodium Channel Expression in Optic Nerve Astrocytes Chronically Deprived of Axonal Contact." Glia **6**: 19-29.
- Mohler, J. L., Partin, A. W., Coffey, D. S. (1987). "Prediction of metastatic potential by a new grading system of cell motility: validation in the Dunning R-3327 prostatic adenocarcinoma model." J. Urol. **138**: 168-170.
- Neher, E. and Sakman, B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers." Nature **260**: 799-801.
- Nilius, B. and Droogmans, G. (1994). "A role for K⁺-Channels in cell proliferation." News Physiol.Sci **9**: 105-110.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T. et al. (1984). "Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence." Nature **312**(5990): 121-7.
- Obara, Y., Nakahata, N., Kita, T., Takaya, Y., Kobayashi, H., Hosoi, S. et al. (1999). "Stimulation of neurotrophic factor secretion from 1321N1 human astrocytoma cells by novel diterpenoids, scabronines A and G." Eur J Pharmacol **370**(1): 79-84.

- Obara, Y., Nakahata, N., Ohizumi, Y. (1998). "A new factor derived from 1321N1 human astrocytoma cells causes differentiation of PC-12 cells mediated through mitogen-activated protein kinase cascade." Brain Res **806**(1): 79-88.
- Ogata, K., Jeong, S. Y., Murakami, H., Hashida, H., Suzuki, T. et al. (2000). "Cloning and expression study of the mouse tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel alpha subunit NaT/Scn11a." Biochem Biophys Res Commun **267**(1): 271-7.
- Ogata, N. and Ohishi, Y (2002). "Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels." Jpn J Pharmacol **88**(4): 365-77.
- Oh, Y., Black, J. A., Waxmann, S. G. (1994). "The expression of rat brain voltage-sensitive Na⁺ channel mRNAs in astrocytes." Brain Res Mol Brain Res **23**(1-2): 57-65.
- Pancrazio, J. J., Viglione, M. P., Tabbara, I. A., Kim, Y. (1989). "Voltage-dependent ion channels in small-cell lung cancer cells." Cancer Res **49**(21): 5901-6.
- Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science **246**(4930): 603-8.
- Patt, S., Labrakakis, C., Bernstein, M., Weydt, P., Cervos-Navarro, J., Nisch, G., Kettenmann, H. (1996). "Neuron-like physiological properties of cells from human oligodendroglial tumors." Neuroscience **71**: 260-269.
- Patt, S., Steenbeck, J. Hochstetter, A., Kraft, R. Huonker, R., Haueisen, J., Haberland, N., Ebmeier, K., Hliscs, R., Fiehler, J., Nowak, H., Kalff, R. (2000). "Source localization and possible causes of interictal epileptic activity in tumor-associated epilepsy." Neurobiol Dis **7**(4): 260-9.
- Pauwels, P. J., Leysen, J. E., Janssen, P. A. (1991). "Ca⁺⁺ and Na⁺ channels involved in neuronal cell death. Protection by flunarizine." Life Sci **48**(20): 1881-93.
- Pauwels, P. J., Van Assouw, H. P., Peeters, L., Leysen, J. E. (1990). "Neurotoxic action of veratridine in rat brain neuronal cultures: mechanism of neuroprotection by Ca⁺⁺ antagonists nonselective for slow Ca⁺⁺ channels." J Pharmacol Exp Ther **255**(3): 1117-22.
- Pflug, B. R., Colangelo, A. M., Tornatore, C., Mochetti, I. (2001). "TrkA induces differentiation but not apoptosis in C6-2B glioma cells." J Neurosci Res **64**(6): 636-45.
- Plummer, N. W. and Meisler, M. H. (1999). "Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes." Genomics **57**(2): 323-31.

- Preussat, K., Beetz, C., Schrey, M., Kraft, R., Wölfl, S., Kalff, R., Patt, S. (2003). "Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas." Neurosci Lett **346**(1-2): 33-6.
- Rabizadeh, S., Ye, X., Wang, J. J., Bredesen, D. E. (1999). "Neurotrophin dependence mediated by p75NTR: contrast between rescue by BDNF and NGF." Cell Death Differ **6**(12): 1222-7.
- Rane, S. G. (1999). "Potassium channels as targets for modulating cell growth and differentiation." Perspect Drug Discovery Design **16**: 295-311.
- Rose, C. R., Ransom, B. R., Waxmann, S. G. (1997). "Pharmacological characterization of Na⁺ influx via voltage-gated Na⁺ channels in spinal cord astrocytes." J Neurophysiol **78**(6): 3249-58.
- Sangameswaran, L., Fish, L. M., Koch, B. D., Rabert, D. K., Delgado, S. G., Illicka, M., Jakeman L. B., Novakovic, S., Wong, K., Sze, P., Tzoumaka, E., Stewewart, G. R. et al. (1997). "A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia." J Biol Chem **272**(23): 14805-9.
- Schaller, K. L., Krzemien, D. M., Yarowski, P. J., Krueger, B. K., Caldwell, J. H. (1995). "A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia." J Neurosci **15**: 3231-3242.
- Schmidt, R. F. and Thews, G. (1993). Physiologie des Menschen. Heidelberg, Springer Verlag.
- Schrey, M., Codina, C., Kraft, R., Beetz, C., Kalff, R., Wölfl, S., Patt, S. (2002). "Molecular charakterisation of voltage- gated sodium channels in human gliomas." Neuroreport **13**: 2493-2498.
- Singer, H. S., Hansen, B., Martinie, D., Karp, C. L. (1999). "Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors." J Neurooncol **45**(1): 1-8.
- Smith, P., Rhodes, N. P., Shortland, A. P., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., Ke, Y., Foster, C. S. (1998). "Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells." FEBS Lett **423**(1): 19-24.
- Smith, R. D. and Goldin, A. L. (1998). "Functional analysis of the rat I sodium channel in xenopus oocytes." J Neurosci **18**(3): 811-20.

Snider, W. D. (1994). "Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us." Cell **77**(5): 627-38.

Sontheimer, H. (1994a). "Voltage-dependent ion channels in glial cells." Glia **11**(2): 156-72.

Sontheimer, H., Black, J. A., Waxmann, S. G. (1996). "Voltage-gated Na⁺ channels in glia: properties and possible functions." Trends Neurosci **19**(8): 325-31.

Sontheimer, H., Fernandez-Marques, E., Ullrich, N., Pappas, C. A., Waxmann, S.G. (1994b). "Astrocyte Na⁺ channels are required for maintenance of Na⁺/K⁺-ATPase activity." J Neurosci **14**(5 Pt 1): 2464-75.

Sontheimer, H., Minturn, J. E., Black, J. A., Ransom, B. R., Waxmann, S. G. (1991). "Two Types of Na⁺ -Currents in Cultured Rat Optic Nerve Astrocytes: Changes With Time in Culture and With Age of Culture Derivation." Journal of Neuroscience Research **30**: 275-278.

Suzuki, H., Beckh, S., Kubo, H., Yahagi, N., Ishida, H., et al. (1988). "Functional expression of cloned cDNA encoding sodium channel III." FEBS Lett **228**(1): 195-200.

Tanaka, S. and T. Koike (1997). "Veratridine delays apoptotic neuronal death induced by NGF deprivation through a Na⁺-dependent mechanism in cultured rat sympathetic neurons." Int J Dev Neurosci **15**(1): 15-27.

Terlau, H., Heinemann, S. H., Stuhmer, W., Pusch, M. et al. (1991). "Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II." FEBS Lett **293**(1-2): 93-6.

Tornatore, C., Rabin, S. Baker-Cairns, B., Keir, S., Mocchetti, I. (1997). "Engraftment of C6-2B cells into the striatum of ACI nude rats as a tool for comparison of the in vitro and in vivo phenotype of a glioma cell line." Cell Transplant **6**(3): 317-26.

Ullrich, N. (1999). "The role of ion channels in cell proliferation." Neuroscientist **5**: 70-73.

Verheugen, J. A., Oortgiesen, M., Vijverberg, H. P. (1994). "Veratridine blocks voltage-gated potassium current in human T lymphocytes and in mouse neuroblastoma cells." J Membr Biol **137**(3): 205-14.

Vinore, S. A. and Koestner, A. (1980). "The effect of nerve growth factor on undifferentiated glioma cells." Cancer Lett **10**(4): 309-18.

- Wang, H., Zhang, Y., Cao, L., Han, H., Wang, J., Yang, B., Nattel, S., Wang, Z. (2002). "HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation." Cancer Res **62**(17): 4843-8.
- Wang, J. J., Rabizadeh, S., Tasinato, A. Sperandio, S., Ye, X., Green, M., Assa-Munt, N., Spencer, D., Bredesen, D. E. (2000). "Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR)." J Neurosci Res **60**(5): 587-93.
- Washiyama, K., Muragaki, Y., Rorke, L. B., Lee, V. M., Feinstein, S. C., Radeke, M. J., Blumberg, D., Kaplan, D. R., Trojanowski, J. Q. (1996). "Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system." Am J Pathol **148**(3): 929-40.
- Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sago, N., Yamamoto, T., Saegusa, C., Noda, M. (2000). "Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS." J Neurosci **20**(20): 7743-51.
- Watanabe, T., Katayama, Y., Kimura, S., Yoshino, A. (1999). "Control of proliferation and survival of C6 glioma cells with modification of the nerve growth factor autocrine system." J Neurooncol **41**(2): 121-8.
- Westphal, M. and Herrmann, H. D. (1989). "Growth factor biology and oncogene activation in human gliomas and their implications for specific therapeutic concepts." Neurosurgery **25**(5): 681-94.
- Wiestler, O. D. und Schmidt, M. C. (1998). "Neuropathologie maligner Gliome." Onkologe **4**: 580-588.
- Wlasak, R. (2004). Die Bedeutung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen für Proliferation und Migration der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y Dissertationsschrift. Institut für Pathologie. Jena, Friedrich-Schiller-Universität.
- Wonderlin, W. F. and Strobl, J. S. (1996). "Potassium channels, proliferation and G1 progression." J Membr Biol **154**(2): 91-107.
- Xie, Y., Dengler, K., Zacharias E., Wilffert, B., Tegtmeier, F. (1994). "Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) on cellular ion homeostasis in rat brain subjected to complete ischemia." Brain Res **652**(2): 216-24.

Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T., Mc Kinnon, (1991). "Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel." Science **251**(4996): 939-42.

Yoon, S. O., Casaccia-Bonnel, P. Carter, B., Chao, M. V. (1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." J Neurosci **18**(9): 3273-81.

Yu, F. H. and Catterall, W. A. (2003). "Overview of the voltage-gated sodium channel family." Genome Biol **4**(3): 207. Epub 2003 Feb 24.

Zhou, Q., Kwan, H. Y., Chan, H.C., Jiang, J. L., Tam, S.C., Yao, X. (2003). "Blockage of voltage-gated K⁺ channels inhibits adhesion and proliferation of hepatocarcinoma cells." Int J Mol Med **11**(2): 261-6.

11. Danksagung

Für das interessante Thema und die verständnisvolle Betreuung danke ich Herrn Professor Dr. S. Patt.

Bei Frau Antje Raabe möchte ich mich für die große Unterstützung bei der technischen Durchführung der Versuche bedanken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse danke ich Frau Antje Brandstädt vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena.

12. Lebenslauf

Name: Rüdiger Feltz
Geb.: 09.09.1958 in Leipzig

Schulbildung

1965-1970 Besuch der Grundschule in Jena
1970-1975 Besuch einer Schule mit erweitertem Sprachunterricht in Jena
1975-1977 Besuch der Erweiterten Oberschule in Jena
1977 Abitur

1977-1980 Militärdienst

Studium

10/1980 bis 06/1985 Studium der Humanmedizin am Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin. Arbeit am Diplomthema: Herstellung und Reinigung von Extrakten aus roten Blutzellen für die gaschromatographische Bestimmung von Metaboliten des Citratzyklus.
09/1985-1986 Pflichtassistent an der Medizinischen Akademie Erfurt in den Fächern Chirurgie, Neurochirurgie, Pädiatrie sowie Einsatz im Krankenhaus in Managua. Abschluß des Studiums mit der Verteidigung der Diplomarbeit und der Erteilung der ärztlichen Approbation zum 01.09.1986.

Beruflicher Werdegang

09/1986-11/1988 Absolventeneinsatz als Militärarzt in einem NVA-Truppenteil.
12/1988 Beginn der Facharztweiterbildung im Fach Neurochirurgie an der Medizinischen Akademie Erfurt. 1994 Anerkennung zum Facharzt für Neurochirurgie, seit 03/2002 Oberarzt in der Klinik für Neurochirurgie am Helios-Klinikum Erfurt.

Erfurt, 20.09.04

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. S. Patt, Dipl.-Math. A. Brandstädt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 20.09.2004